

# **Avaliação das Espécies Reativas de Oxigénio e Nitrogénio em Espermatozoides Humanos e sua Aplicação em Técnicas de Procriação Medicamente Assistida**

**Francisca Goulão Mora**

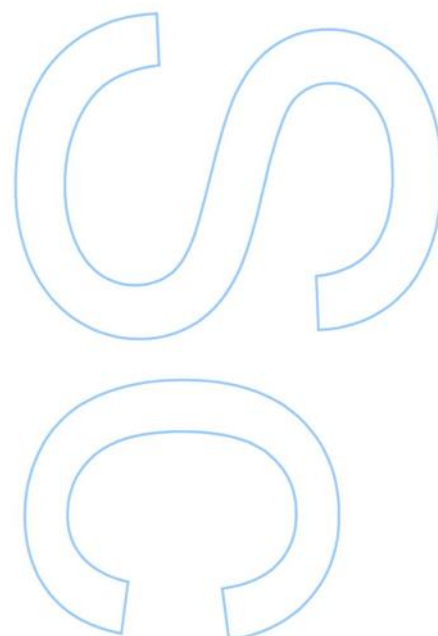
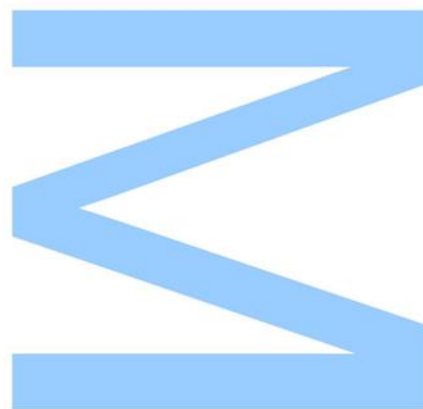
Mestrado em Bioquímica  
Departamento de Química e Bioquímica  
2016

## **Orientador**

Vasco Manuel Martins de Almeida, Professor Auxiliar,  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Coorientador**

João Ramalho de Sousa Santos, Professor Associado com  
Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra







**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**U. PORTO**



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram  
efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**N**

**S**

**C**



## Agradecimentos

Ao Professor Pedro Fernandes, agradeço por me ter dado a conhecer o Mestrado em Bioquímica, pelos conhecimentos que me transmitiu e por ter permitido que eu pudesse realizar o meu trabalho de dissertação fora do Porto, na área de que eu mais gosto.

Ao Professor Vasco Almeida, meu orientador, estou muito agradecida pela oportunidade que me concedeu em estagiar no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade, no qual tive o primeiro contacto com a área da Biologia da Reprodução, e pelos conhecimentos que me transmitiu.

Ao Professor João Ramalho, meu coorientador, agradeço profundamente ter-me aceitado naquele que é, para mim, um grupo de excelência - o Grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais - e por me ter desafiado sempre a chegar mais além, pelo meu próprio mérito. Agradeço todas as críticas construtivas e a oportunidade de (finalmente) aprender com o Professor.

À Ana Paula, agradeço todo o conhecimento transmitido, o auxílio prestado - particularmente quando os computadores decidiam virar-se contra mim - e, especialmente, o incentivo que me deu para trabalhar autonomamente, contribuindo para o meu crescimento pessoal mas também profissional.

À Doutora Isabel Damião, agradeço ter-me introduzido à área da Biologia da Reprodução, todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas (típicas de novata) e companheirismo. Segue, igualmente, um forte agradecimento à Ana Gomes.

À Professora Doutora Teresa Almeida Santos, estou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Agradeço igualmente a todos os funcionários deste serviço, e, em especial, à Raquel, à Rita e à Nené.

A todos os membros do Laboratório de Citogenética, agradeço a colaboração e, em especial ao Doutor Artur Paiva, agradeço por ter permitido que realizasse grande parte do meu trabalho no seu serviço, sua disponibilidade e auxílio.

À Susana Santos e à Susana Pedreiro, por terem sido incansáveis em ajudar-me com a citometria de fluxo.

Ao Professor António Moreno, ao Professor Doutor João Laranjinha, à Doutora Ana Ledo e à Cândida Dias agradeço toda a disponibilidade, ajuda e o contributo que deram ao meu trabalho.

Um forte agradecimento aos colegas do grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais e, em especial à Sandra, à Sofia, à Maria Inês, à Renata, à Paula, ao Marcelo, ao Marcelo Ribeiro e ao Sandro. Agradeço todo o apoio prestado, companheirismo e críticas construtivas.

Não podia deixar de agradecer à Sara e à Alexandra, pela amizade, companheirismo, apoio e conhecimentos transmitidos.

Um obrigado aos colegas do Porto, com quem forjei amizades para a vida, agradeço o apoio e a amizade.

Aos meus amigos, especialmente Afife, Maiores e Fantastic4, agradeço terem perdoado a minha ausência durante este ano, mas também todo o apoio prestado, alegrias partilhadas e encorajamento.

Aos meus avós, agradeço profundamente terem sempre apoiado a minha educação e terem-me ensinado a ser uma pessoa trabalhadora.

À minha família, agradeço todo o apoio e os momentos de descontração.

Aos meus pais, à Filipa e ao Francisco, agradeço o quanto me apoiaram e acreditam em mim, terem-me aturado em modo stressada, mas também por me terem proporcionado momentos de diversão.

Ao Zoni, agradeço o companheirismo, as risotas e as alegrias partilhadas, mas, especialmente, o quão me encorajou e me ouviu quando mais precisava.



## Resumo

Os radicais livres são intermediários químicos que possuem um ou mais eletrões não emparelhados. No espermatozoide humano há produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), nomeadamente o anião superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) de origem mitocondrial e citosólica - produzido pela isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5) - e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produzido pela enzima superóxido dismutase (SOD). Além da produção de ROS, o espermatozoide produz também espécies reativas de nitrogénio (RNS), nomeadamente o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) a partir das isoformas da NO sintase (NOS).

Uma produção controlada de ROS/RNS é requerida para processos da fisiologia normal do espermatozoide, tais como a capacitação, a reação acrossómica, o movimento hiperativo e a ligação à zona pelúcida do oócito. Todavia, quando a produção de ROS/RNS prevalece sobre a sua neutralização/metabolização, está-se perante uma situação de *stress* oxidativo.

O *stress* oxidativo é apontado como uma importante causa da infertilidade masculina idiopática, sendo que este é o principal responsável pelo surgimento de espermatozoides com uma função alterada, caracterizada pela perda de potencial de fertilização.

Tendo em conta que nos últimos anos tem havido um grande interesse em estudar-se o envolvimento do *stress* oxidativo na infertilidade masculina idiopática, é essencial otimizar-se métodos de deteção das ROS/RNS no Sistema Reprodutor Masculino e estudar-se o efeito das mesmas na infertilidade masculina. Para tal, recorre-se, comumente, ao uso de sondas fluorescentes que sejam sensíveis às ROS/RNS que se pretende detetar.

No presente trabalho, e tendo em conta a literatura, pretende-se utilizar a sonda MitoSOX™ Red (Molecular Probes; Eugene, Oregon, EUA) para detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  de origem mitocondrial; a sonda DHE (dihidroetídio; Molecular Probes) para detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico; a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 (Molecular Probes), que é indicadora da atividade oxidativa das células, contudo procurou-se perceber se esta sonda seria sensível a alguma ROS; a sonda CellROX® Orange Reagent (Molecular Probes) para detetar ROS; a sonda MitoPY1 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido) para detetar  $\text{H}_2\text{O}_2$  na mitocôndria; e, por último, a sonda DAF-2 DA (4,5-diamino fluoresceína diacetato; Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EUA) com o intuito de detetar  $\text{NO}\bullet$ .

Considerando a informação mencionada, este estudo teve como objetivos principais a caracterização das sondas fluorescentes - qual a concentração de sonda a usar, onde é que no espermatozoide aparece marcação, a que ROS/RNS é que cada



sonda é sensível, qual o meio de cultura mais apropriado e verificar se há alguma correlação entre as sondas fluorescentes - e a comparação dos resultados da utilização das sondas com os dados relativos aos espermatozoides (volume do ejaculado, pH do ejaculado, concentração espermática, motilidade espermática, morfologia espermática e concentração de leucócitos) e de resultados das técnicas de procriação medicamente assistida (as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário e a obtenção de gravidez).

Em relação à primeira parte deste estudo, concluiu-se que (i) as sondas MitoSOX™ Red e DHE, na presença de  $H_2O_2$  e de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial, apresentam marcação na cabeça do espermatozoide, (ii) a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 apresenta marcação na peça intermédia e na cabeça do espermatozoide, caso haja a presença de  $H_2O_2$ , (iii) a sonda CellROX® Orange Reagent apresenta marcação na peça intermédia caso haja a presença de  $H_2O_2$ , (iv) a sonda MitoPY1, na presença de  $H_2O_2$  na mitocôndria, apresenta marcação na peça intermédia e (v) a sonda DAF-2 DA apresenta marcação na peça intermédia caso haja a presença de  $NO^\bullet$ . Verificou-se que existe uma forte correlação positiva entre as sondas MitoSOX™ Red e DHE, e que a primeira se correlaciona positivamente com as sondas MitoPY1 e RedoxSensor™ Red CC-1 e negativamente com a sonda DAF-2 DA. Concluiu-se ainda que todas as sondas devem ser, preferencialmente, adicionadas às suspensões celulares em PBS suplementado e os resultados obtidos por citometria de fluxo devem ser analisados tendo em conta a intensidade média de fluorescência, para que estes sejam mais fidedignos.

Quanto à segunda parte do presente estudo, foi possível inferir que, em amostras de indivíduos com oligozoospermia, poderá haver uma maior concentração de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e de  $H_2O_2$ , e o mesmo se constatou para amostras astenozoospermicas. Porém, relativamente às amostras de indivíduos com teratozoospermia, este estudo provou-se inconclusivo. Concluiu-se assim que amostras que possuam níveis elevados de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e de  $H_2O_2$  têm, provavelmente, um dos parâmetros de qualidade espermática - concentração e motilidade dos espermatozoides - alterado ou mesmo os dois. Relativamente à presença de leucócitos no ejaculado, este estudo prevê, sem significância estatística, que amostras que tenham mais do que um milhão de leucócitos por mL de ejaculado possam ter níveis de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e de  $H_2O_2$  superiores às que são normozoospermicas, e estas, por sua vez poderão ter níveis de  $NO^\bullet$  superiores às que são leucocitospermicas. Verificou-se ainda que não existem quaisquer correlações entre as ROS/RNS e os resultados das técnicas de PMA.

Concluiu-se assim que as sondas MitoSOX™ Red, DHE, CellROX® Orange Reagent e MitoPY1 e a sonda DAF-2 DA podem ser utilizadas para a deteção de ROS e de RNS, respetivamente, em espermatozoides humanos, tanto num contexto de investigação como de PMA, e que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera o estado *redox* do espermatozoide, podendo esta alteração ser detetada através da sonda RedoxSensor™ Red CC-1.

**Palavras-chave:** infertilidade masculina idiopática, espermatozoide humano, •O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial e citosólico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO•, sondas fluorescentes, parâmetros de qualidade espermática, PMA

## Abstract

Free radicals are chemical intermediates that have one or more unpaired electrons. Spermatozoa are able to generate reactive oxygen species (ROS) such as mitochondrial superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), cytosolic  $\bullet\text{O}_2^-$  - generated by the isoform 5 of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase system (NOX5) - and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produced by superoxide dismutase (SOD). Besides ROS, spermatozoa are able of generating reactive nitrogen species (RNS), namely nitric oxide ( $\text{NO}\bullet$ ) synthesized by NO synthase (NOS).

A controlled production of ROS/RNS is required for processes of the normal physiology of sperm, such as capacitation, acrosome reaction, hyperactivation and zona pellucida-binding. However, when the production of ROS/RNS prevails over their neutralization/ metabolization, oxidative stress occurs.

Oxidative stress is identified as a major cause of idiopathic male infertility and it is the main cause for defective sperm function, characterized by loss of fertilizing potential.

Given that in recent years there has been a great interest in studying the role of oxidative stress in idiopathic male infertility, it is essential to optimize methods for detecting ROS/RNS in the Male Reproductive System and to study their effect on male infertility. To such end, one should use fluorescent probes that are sensitive to the specific ROS/RNS which one intends to detect.

In the present work, and taking literature into account, the MitoSOX™ Red probe (Molecular Probes; Eugene, Oregon, USA) was used to detect mitochondrial  $\bullet\text{O}_2^-$ ; the DHE probe (dihydroethidium; Molecular Probes) was used to detect cytosolic  $\bullet\text{O}_2^-$ ; the RedoxSensor™ Red CC- 1 probe (Molecular Probes), used as an indicator of oxidative activity in living cells, however we tried to understand if this probe could be sensitive to any ROS; the CellROX® Orange Reagent probe (Molecular Probes) was used to detect ROS; the MitoPY1 probe (Tocris Bioscience; Bristol, UK) was used to detect  $\text{H}_2\text{O}_2$  in mitochondria; and, finally, the DAF -2 DA probe (4,5- diaminofluorescein diacetate; Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, USA) was used in order to detect  $\text{NO}\bullet$ .

Considering the aforementioned information, this study had two main goals (i) the characterization of the fluorescent probes - what is the right concentration for each probe, where in the spermatozoon does the staining appear, to what ROS/RNS each probe is sensitive to, which culture media is more suitable and check if there is any correlation between the fluorescent probes - and (ii) the comparison of the results obtained from using the probes with sperm-related data (volume of the ejaculate, pH of the ejaculate, sperm concentration, sperm motility, sperm morphology and leukocyte concentration)

and results of assisted reproductive techniques (ART; such as rates of fertilization and embryo development and achievement of pregnancy).

In the first part of this study, it was concluded that (i) MitoSOX™ Red and DHE, in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and mitochondrial •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, stain the head of the spermatozoon, (ii) RedoxSensor™ Red CC- 1 stains the midpiece and the head of the spermatozoon in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (iii) CellROX® Orange Reagent stains the midpiece, in case there is the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (iv) MitoPY1, in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the mitochondria, stains the midpiece, (v) DAF-2 DA stains the midpiece, in case there is the presence of NO•. It was also concluded that there is a strong positive correlation between MitoSOX™ Red and DHE, and the first also positively correlates with MitoPY1 and RedoxSensor™ Red CC-1 and negatively correlates with DAF-2 DA. Moreover, we propose that all probes should preferably be added to the cell suspensions in supplemented PBS and that the results obtained by flow cytometry should be analyzed according to the mean fluorescence intensity, so that they can be more reliable.

In the second part of this study, it was possible to infer that samples of individuals with oligozoospermia may have a higher concentrations of mitochondrial •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the same was also concluded for the asthenozoospermic samples. However, regarding the samples from individuals with teratozoospermia, this study proved to be inconclusive. Thus, samples which have elevated mitochondrial •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels could have one or both altered sperm quality parameters (concentration and motility). Regarding the presence of leukocytes in the ejaculate, this study predicts, with no statistical significance, that samples, which have more than one million leukocytes per mL of ejaculate, may have higher levels of mitochondrial •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than those which are normozoospermic, and these, in turn, may have higher levels of NO• than the ones that are leukocytospermic. In this study we did not find correlations between ROS/RNS and the results of ART.

It was concluded that MitoSOX™ Red, DHE, CellROX® Orange Reagent and MitoPY1 and DAF-2 DA can be used to detect ROS and RNS, respectively, on human spermatozoa, either in research or in an ART context and that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alters spermatozoon's redox state and this alteration could be detected by the RedoxSensor™ Red CC-1 probe.

**Keywords:** idiopathic male infertility, human spermatozoon, mitochondrial and cytosolic •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO•, fluorescent probes, sperm quality parameters, ART

## Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice.....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xx</b>
 <b>Capítulo 1 – Introdução.....</b>	 <b>1</b>
1.1 Infertilidade – Fator Masculino.....	2
1.2 Sistema Reprodutor Masculino.....	4
1.3 O Espermatozoide.....	5
1.4 Espermatogénese, Espermiogénese e Espermiacção.....	7
1.4.1 Regulação Hormonal da Espermatogénese.....	9
1.5 Capacitação.....	10
1.6 Reação Acrossómica.....	11
1.7 Infertilidade Masculina e Espécies Reativas de Oxigénio e de Nitrogénio.....	12
1.7.1 Espécies Reativas de Oxigénio e de Nitrogénio e o Espermatozoide.....	12
1.7.1.1 Fontes Endógenas de ROS e de RNS.....	14
1.7.1.1.1 NOX5.....	14
1.7.1.1.2 Mitocôndria.....	14
1.7.1.1.3 Espermatozoides Imaturos e Leucócitos.....	17
1.7.1.1.4 NO Sintase.....	17
1.7.1.2 Defesas Antioxidantes.....	18
1.7.1.3 Efeitos das ROS/RNS no Espermatozoide.....	19
1.7.1.3.1 Efeitos Positivos.....	19
1.7.1.3.2 Efeitos Negativos.....	19
1.7.1.4 Detecção de ROS/RNS.....	22
1.8 Objetivos.....	23
 <b>Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....</b>	 <b>25</b>
2.1 Reagentes e Soluções.....	26
2.2 Material Biológico.....	26
2.2.1 Preparação do Material Biológico.....	27
2.2.2 Parâmetros de Qualidade Espermática.....	27

2.2.2.1	Concentração de Espermatozoides e de Leucócitos.....	27
2.2.2.2	Motilidade Espermática.....	28
2.2.2.3	Morfologia Espermática.....	28
2.3	Sondas Fluorescentes.....	29
2.3.1	MitoSOX™ Red.....	29
2.3.2	DHE.....	29
2.3.3	RedoxSensor™ Red CC-1.....	30
2.3.4	CellROX® Orange Reagent.....	30
2.3.5	MitoPY1.....	31
2.3.6	DAF-2 DA.....	31
2.4	Microscopia de Epifluorescência.....	32
2.4.1	Preparação das Suspensões Celulares.....	32
2.5	Citometria de Fluxo.....	33
2.5.1	Preparação das Suspensões Celulares .....	33
2.5.1.1	MitoSOX™ Red.....	34
2.5.1.2	DHE.....	34
2.5.1.3	RedoxSensor™ Red CC-1.....	34
2.5.1.4	CellROX® Orange Reagent.....	35
2.5.1.5	MitoPY1.....	35
2.5.1.6	DAF-2 DA.....	35
2.5.2	Controlos Positivos.....	36
2.6	Caraterização das Sondas Fluorescentes .....	37
2.7	Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de PMA.....	37
2.8	Análise Estatística.....	38
<b>Capítulo 3 – Resultados.....</b>		<b>39</b>
3.1	Caraterização das Sondas Fluorescentes.....	40
3.1.1	Tampão Fosfato Salino Suplementado vs <i>Sperm Preparation Medium</i> .....	40
3.1.2	MitoSOX™ Red.....	41
3.1.3	DHE.....	46
3.1.4	RedoxSensor™ Red CC-1.....	52
3.1.5	CellROX® Orange Reagent.....	58
3.1.6	MitoPY1.....	64
3.1.7	DAF-2 DA.....	70
3.1.8	Correlações Entre as Sondas Fluorescentes.....	72

3.2 Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de	Procriação	Medicamente	
Assistida.....			73
3.2.1 Parâmetros de Qualidade Espermática.....			73
3.2.1.1 Concentração Inicial de Espermatozoides.....			73
3.2.1.2 Motilidade Progressiva dos Espermatozoides.....			76
3.2.1.3 Morfologia dos Espermatozoides.....			78
3.2.1.4 Normozoospermia vs Não Normozoospermia.....			80
3.2.1.5 Concentração de Leucócitos no Ejaculado.....			82
3.2.1.6 Correlações Entre as Sondas Fluorescentes e Parâmetros de Qualidade Espermática.....			84
3.2.2 Resultados das Técnicas de Procriação Medicamente Assistida.....			86
3.2.2.1 Gravidez Bioquímica.....			86
3.2.2.2 Gravidez Clínica.....			88
<b>Capítulo 4 – Discussão.....</b>			<b>91</b>
4.1 Caracterização das Sondas Fluorescentes.....			93
4.1.1 Tampão Fosfato Salino Suplementado vs <i>Sperm Preparation Medium</i> .....			93
4.1.2 Percentagem de Células Marcadas vs Intensidade Média de Fluorescência.....			93
4.1.3 MitoSOX™ Red.....			95
4.1.4 DHE.....			97
4.1.5 RedoxSensor™ Red CC-1.....			98
4.1.6 CellROX® Orange Reagent.....			99
4.1.7 MitoPY1.....			101
4.1.8 DAF-2 DA.....			102
4.1.9 Correlações Entre as Sondas Fluorescentes.....			103
4.2 Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de PMA.....			106
4.2.1 Concentração Inicial de Espermatozoides.....			106
4.2.2 Motilidade dos Espermatozoides.....			107
4.2.3 Morfologia dos Espermatozoides.....			109
4.2.4 Normozoospermia vs Não Normozoospermia.....			110
4.2.5 Concentração de Leucócitos no Ejaculado.....			111
4.2.6 Resultados das Técnicas de PMA.....			112
<b>Capítulo 5 – Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>			<b>114</b>
<b>Capítulo 6 – Referências Bibliográficas.....</b>			<b>117</b>

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>FIV</b> Fertilização <i>in vitro</i>
<b>ADP</b> Adenosina difosfato	<b>FSC</b> <i>Forward scatter</i>
<b>ATP</b> Trifosfato de adenosina	<b>FSH</b> Hormona folículo-estimulante
<b>BAPTA</b> Ácido 1,2-bis(2-aminofeniloxi)etano-N,N,N',N'-tetra-acético	<b>GnRH</b> Hormona libertadora de gonadotropinas
<b>Ca<sup>2+</sup></b> Ião cálcio	<b>H<sup>+</sup></b> Protão ou ião hidrogénio
<b>CaCl<sub>2</sub></b> Cloreto de cálcio	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrogénio
<b>cAMP</b> Monofosfato cíclico de adenosina	<b>ICSI</b> Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
<b>cGMP</b> Monofosfato cíclico de guanosina	<b>IUI</b> Inseminação intrauterina
<b>CHUC</b> Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	<b>iNOS</b> Isoforma induzível da NOS
<b>CTE</b> Cadeia transportadora de eletrões	<b>IP3</b> 1,4,5-trifosfato de inositol
<b>DAF-2</b> 4,5-Diamino fluoresceína	<b>KCl</b> Cloreto de potássio
<b>DAF-2 DA</b> 4,5-Diamino fluoresceína diacetato	<b>LH</b> Hormona luteinizante
<b>DAF-2T</b> Triazol fluoresceína	<b>MgCl<sub>2</sub></b> Cloreto de magnésio
<b>DAG</b> 1,2-diacilglicerol	<b>Motilidade progressiva (A+B)</b> Motilidade progressiva rápida e lenta
<b>DCFH-DA</b> Diclorodihidrofluoresceína diacetato	<b>NaCl</b> Cloreto de sódio
<b>DHA</b> Ácido docosahexaenóico	<b>NADH</b> Nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzida
<b>DHE</b> Dihidroetídio	<b>NADP<sup>+</sup></b> Nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato
<b>EDTA</b> Ácido etilenodiamino tetra-acético	<b>NADPH</b> Nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida
<b>eNOS</b> Isoforma endotelial da NOS	<b>NaOH</b> Hidróxido de sódio
<b>FITC</b> Isotiocianato de fluoresceína	<b>nNOS</b> Isoforma neuronal da NOS



**NO•** Óxido nítrico

**NOS** NO sintase

**NOX** Sistema nicotinamida-adenina  
dinucleótido de fosfato reduzida oxidase

**NOX 5** Isoforma 5 do sistema  
nicotinamida-adenina dinucleótido de  
fosfato reduzida oxidase

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Anião superóxido

**•OH** Radical hidroxilo

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**ONOO<sup>-</sup>** Peroxinitrito

**PBS** Tampão fosfato salino

**PE** Fluoróforo ficoeritrina

**Pi** Fosfato inorgânico

**PKA** Proteína cinase A

**PMA** Procriação Medicamente Assistida

**PUFA** Ácidos gordos polinsaturados

**Q** Ubiquinona

**•QH** Radical semiquinona

**RNS** Espécies reativas de nitrogénio

**ROS** Espécies reativas de oxigénio

**SACY** Adenil ciclase solúvel

**SOD** Superóxido dismutase

**SPM** *Sperm preparation medium*

**SSC** *Side scatter*

**TPP** Catião trifenilfosfónio

**VDAC** Canal aniónico dependente de  
voltagem

## Lista de Figuras

**Figura 1** - Esquema representativo da constituição celular dos túbulos seminíferos e do tecido intertubular. Adaptado de: <http://studentblogs.med.ed.ac.uk/reproductive-systems-group-4/sertoli-cell-differentiation-and-function/>, acedido a 10/11/2015.

**Figura 2** - Ilustração do espermatozoide humano. Adaptado de: <http://www.biology.lifeeasy.org/95/what-is-the-structure-of-a-mature-human-sperm-cell>, acedido a 12/11/2015.

**Figura 3** - Ilustração da localização, no Sistema Reprodutor Masculino, dos túbulos seminíferos - local onde ocorre a espermatogénese - e esquema representativo das diferentes fases da mesma. Adaptado de: <http://www.bio.utexas.edu/faculty/sjasper/Bio301L/ReviewExamIV.html>, acedido a 12/11/2015.

**Figura 4** - O *stress* oxidativo e o espermatozoide. Adaptado de Agarwal *et al.*, 2014.

**Figura 5** - Representação esquemática da interação entre a isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5) com o ião cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Adaptado de Musset *et al.*, 2012.

**Figura 6** - A cadeia transportadora de eletrões (CTE) e a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) na mitocôndria. Adaptado de Zhang e Guttermann, 2007.

**Figura 7** - MitoSOX<sup>TM</sup> Red e DHE detetam o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Adaptado de: [http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS\\_services.html](http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS_services.html), acedido a 15/03/2016.

**Figura 8** - MitoPY1 deteta peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Adaptado de Dickinson *et al.*, 2013.

**Figura 9** - A 4,5-diamino fluoresceína diacetato (DAF-2 DA) permite a deteção de óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ). Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d225?lang=pt&region=PT>, acedido a 23/03/2016.

**Figura 10** - Controlo Negativo.

**Figura 11** - Tampão fosfato salino (PBS) suplementado vs *sperm preparation medium* (SPM).

**Figura 12** - Avaliação da marcação da sonda MitoSOX<sup>TM</sup> Red no espermatozoide.

**Figura 13** - MitoSOX<sup>TM</sup> Red e os controlos positivos.

**Figura 14** - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e com MitoSOX™ Red e os controlos positivos.

**Figura 15** - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e os controlos positivos.

**Figura 16** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e com MitoSOX™ Red e os controlos positivos.

**Figura 17** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e os controlos positivos.

**Figura 18** - Avaliação da marcação da sonda DHE no espermatozoide.

**Figura 19** - DHE e os controlos positivos.

**Figura 20** - Avaliação da percentagem de células marcadas com DHE e com DHE e os controlos positivos.

**Figura 21** - Avaliação da percentagem de células marcadas com DHE e os controlos positivos.

**Figura 22** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e com DHE e os controlos positivos.

**Figura 23** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e os controlos positivos.

**Figura 24** - Avaliação da marcação da sonda RedoxSensor™ Red CC-1 no espermatozoide.

**Figura 25** - RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos.

**Figura 26** - Avaliação da percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos.

**Figura 27** - Avaliação da percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos.

**Figura 28** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos.

**Figura 29** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos.

**Figura 30** - Avaliação da marcação da sonda CellROX® Orange Reagent no espermatozoide.

**Figura 31** - CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos.

**Figura 32** - Avaliação da percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos.

**Figura 33** - Avaliação da percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos.

**Figura 34** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos.

**Figura 35** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos.

**Figura 36** - Avaliação da marcação da sonda MitoPY1 no espermatozoide.

**Figura 37** - MitoPY1 e os controlos positivos.

**Figura 38** - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoPY1 e com MitoPY1 e os controlos positivos.

**Figura 39** - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoPY1 e os controlos positivos.

**Figura 40** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e com MitoPY1 e os controlos positivos.

**Figura 41** - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e os controlos positivos.

**Figura 42** - Avaliação da marcação da sonda DAF-2 DA no espermatozoide.

**Figura 43** - DAF-2 DA e o controlo positivo.

**Figura 44** - Avaliação da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DAF-2 DA e com DAF-2 DA e o controlo positivo.

**Figura 45** - Sondas fluorescentes e a concentração inicial de espermatozoides.

**Figura 46** - Sondas fluorescentes e a concentração inicial de espermatozoides.

**Figura 47** – Sondas fluorescentes e a motilidade progressiva (rápida e lenta - A+B) dos espermatozoides.

**Figura 48** - Sondas fluorescentes e a motilidade progressiva (rápida e lenta - A+B) dos espermatozoides.

**Figura 49** - Sondas fluorescentes e a morfologia dos espermatozoides.

**Figura 50** - Sondas fluorescentes e a morfologia dos espermatozoides.

**Figura 51** - Sondas fluorescentes e os parâmetros de qualidade espermática.

**Figura 52** - Sondas fluorescentes e os parâmetros de qualidade espermática.

**Figura 53** - Sondas fluorescentes e a concentração de leucócitos no ejaculado.

**Figura 54** - Sondas fluorescentes e a concentração de leucócitos no ejaculado.

**Figura 55** - Sondas fluorescentes e a obtenção de gravidez bioquímica.

**Figura 56** - Sondas fluorescentes e a obtenção de gravidez bioquímica.

**Figura 57** - Sondas fluorescentes e a confirmação de obtenção de gravidez clínica.

**Figura 58** - Sondas fluorescentes e a confirmação de obtenção de gravidez clínica.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Valores mínimos de referência estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS; WHO, 2010) para cada parâmetro em causa de forma a classificar uma amostra de ejaculado como normozoospermica.

**Tabela 2** - Correlações entre as sondas fluorescentes.

**Tabela 3** - Correlações entre as sondas fluorescentes e parâmetros de qualidade espermática.



## **Capítulo 1 - Introdução**



## 1.1 Infertilidade - Fator Masculino

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um casal, cuja mulher após 12 meses de relações sexuais regulares e sem contraceção não tenha engravidado, é considerado infértil (WHO, 2010).

Atualmente estima-se que cerca de 15 a 25% dos casais, a nível mundial, têm problemas de concepção e consequentemente procuram ajuda médica (Agarwal *et al.*, 2014). A causa deste problema tanto pode ser masculina como feminina, sendo que em metade dos casos de infertilidade a causa é masculina (Agarwal *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2012).

Existem inúmeros fatores que podem conduzir à infertilidade masculina, entre eles anomalias congénitas, fatores genéticos, fatores cromossómicos, infeções no trato genital, varicocelo, distúrbios endócrinos, aumento da temperatura do escroto, tumores, e ainda consumo de álcool, drogas e tabaco em excesso (Esteves *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2012). Tais fatores podem impedir a produção de espermatozoides ou diminuir a sua quantidade, alterar a sua qualidade, bloquear a passagem destes para o exterior e ainda contribuir para que os espermatozoides percam a capacidade de fertilizar o oócito (Esteves *et al.*, 2011; Jedrzejowska *et al.*, 2012). Porém a situação agrava-se quando não se consegue identificar nenhuma causa para a infertilidade masculina, que, neste caso, passa a denominar-se por infertilidade masculina idiopática (Agarwal *et al.*, 2014). Hoje em dia, o *stress* oxidativo (tema abordado na secção 1.7.1) é considerado como uma importante causa da infertilidade masculina idiopática (Agarwal *et al.*, 2014; Du Plessis *et al.*, 2010b; Sikka *et al.*, 1995). O *stress* oxidativo é o principal responsável pelo surgimento de espermatozoides com uma função alterada, caracterizada pela perda de potencial de fertilização (Cassina *et al.*, 2015; Treulen *et al.*, 2015).

Para se diagnosticar a infertilidade masculina, o estudo do indivíduo deve incluir a história médica e reprodutiva completa, um exame físico por um urologista e pelo menos dois espermogramas (Esteves *et al.*, 2011). Adicionalmente, podem-se realizar exames andrológicos, endócrinos e ser requerido o cariótipo do indivíduo (Esteves *et al.*, 2011).

O espermograma tem como objetivo a avaliação do ejaculado, composto pelos espermatozoides e pelo líquido seminal. Para a realização de um espermograma, e tendo em conta os critérios da OMS (2010), a amostra a analisar deve ser colhida após 3 a 5 dias de abstinência sexual, sendo obtida por masturbação para um recipiente estéril. Posteriormente, realizam-se as análises macroscópicas, nas quais se pretende avaliar os seguintes parâmetros: cor, opacidade, cheiro, liquefação, volume, viscosidade

e pH do ejaculado, e ainda as análises microscópicas, que procuram avaliar a concentração, morfologia, motilidade, viabilidade dos espermatozoides, presença de agregados de espermatozoides e de leucócitos (WHO, 2010). Na Tabela 1 encontram-se os valores de referência para uma amostra considerada normozoospermica (WHO, 2010).

Tabela 1 – Valores mínimos de referência estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS; WHO, 2010) para cada parâmetro em causa de forma a classificar uma amostra de ejaculado como normozoospermica.

Parâmetro	Valor Mínimo de Referência
<b>Volume do ejaculado</b>	$\geq 1,5$ mL
<b>pH</b>	$\geq 7,2$
<b>Número de Espermatozoides/mL</b>	$\geq 15$ Milhões
<b>Motilidade dos Espermatozoides Progressiva (rápida e lenta)</b>	$\geq 32\%$
<b>Vitalidade dos Espermatozoides</b>	$\geq 58\%$ vivos
<b>Espermatozoides com Morfologia Normal</b>	$\geq 4\%$
<b>Número de Leucócitos/mL</b>	$\leq 1$ Milhão

Por vezes, surgem casos em que os parâmetros indicados na Tabela 1 se encontram alterados, tendo essas alterações designações específicas. O termo oligozoospermia refere-se à condição em que a concentração de espermatozoides é menor que 15 milhões por mL (WHO, 2010). Tendo em conta a motilidade, uma amostra em que menos de 32% dos espermatozoides apresenta motilidade progressiva (rápida e lenta), é considerada como astenozoospermica (WHO, 2010). Designa-se por teratozoospermica a amostra que possuir menos de 4% de espermatozoides que apresentem morfologia normal (WHO, 2010). As amostras de espermatozoides que possuem alterações simultâneas nos três parâmetros são classificadas em oligoastenoteratozoospermicas (WHO, 2010). Por fim, quando a concentração de leucócitos na amostra ultrapassa um milhão por mL de ejaculado, esta classifica-se como leucocitospermica (Henkel *et al.*, 2005).

Perante um diagnóstico de infertilidade existem várias técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) que permitem ultrapassar este problema (WHO, 2010). Destas fazem parte: a inseminação intrauterina (IIU) que tem como base a injeção do sêmen do cônjuge, previamente tratado, na cavidade uterina, através dum cateter muito fino; a fertilização *in vitro* (FIV), que consiste na colocação dos oócitos e dos espermatozoides num meio de cultura apropriado de forma a que a fertilização ocorra, sendo que os embriões resultantes (um ou dois) serão posteriormente transferidos para o útero; e por fim, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), na qual um

espermatozoide é injetado diretamente dentro do oócito, ocorrendo igualmente uma posterior transferência dos embriões resultantes (Lie *et al.*, 2005).

Além do *stress* oxidativo estar implicado na infertilidade masculina idiopática, no contexto da PMA este é um dos maiores problemas (Cassina *et al.*, 2015; Makker *et al.*, 2009). De facto, a preparação das amostras de esperma, que são usadas nas técnicas de PMA, conduz a um aumento do *stress* oxidativo o que poderá ter implicações clínicas relevantes (Bansal e Bilaspuri, 2010). Vários estudos realizados referem que os repetidos ciclos de centrifugação, a que as amostras de esperma são submetidas, podem levar a um aumento do *stress* oxidativo que, consequentemente, poderá afetar gravemente a capacidade dos espermatozoides em fertilizar o gâmeta feminino - oócito (Agarwal *et al.*, 1994; Bansal e Bilaspuri, 2010; Jedrzejowska *et al.*, 2012).

Assim sendo, é de extrema importância procurar otimizar metodologias que permitam avaliar o *stress* oxidativo de uma dada amostra de ejaculado.

## 1.2 Sistema Reprodutor Masculino

O Sistema Reprodutor Masculino é constituído por órgãos externos e internos (Campbell, 2008). O escroto e o pénis são considerados como órgãos externos, enquanto que os internos incluem, não só as gónadas - responsáveis pela produção de gâmetas masculinos, os espermatozoides, e pela produção e secreção de hormonas reprodutivas - e as glândulas acessórias, que secretam fatores essenciais para a motilidade e sobrevivência dos espermatozoides, como também pelos ductos que têm a função de transportar os espermatozoides e as secreções glandulares (Campbell, 2008).

No Sistema Reprodutor Masculino as gónadas correspondem aos testículos que, por sua vez contêm os túbulos seminíferos (Figura 1; Amaral *et al.*, 2013b). Estes últimos consistem em epitélio germinal e em tecido peritubular, sendo que o epitélio contém dois tipos celulares: células somáticas e células germinativas (Amaral *et al.*, 2013b). As células germinativas correspondem às células que, após um longo processo de divisão e diferenciação, se transformam em gâmetas, desde as espermatogónias, que são células estaminais, até aos espermátídios (Figura 1; Fox, 2011). As células somáticas incluem as células de Sertoli que formam a barreira hematotesticular, criando um local imunoprivilegiado nos testículos (Figura 1; Fox, 2011). Além disso, estas células têm outras funções, tais como o fornecimento de nutrientes, a fagocitose de citoplasma no processo de espermição, secreção de fluído testicular para transportar os espermatozoides, produção de substâncias endócrinas e parácrinas que regulam a espermatogénese (tema abordado na secção 1.4; Amaral *et al.*, 2013b). No tecido

intertubular, que rodeia os capilares, localizam-se as células de Leydig (Figura 1), que produzem testosterona (Amaral *et al.*, 2013b). Esta hormona tem um papel preponderante na manutenção da espermatogénese, na diferenciação dos órgãos sexuais masculinos e nas características sexuais secundárias (Fox, 2011).

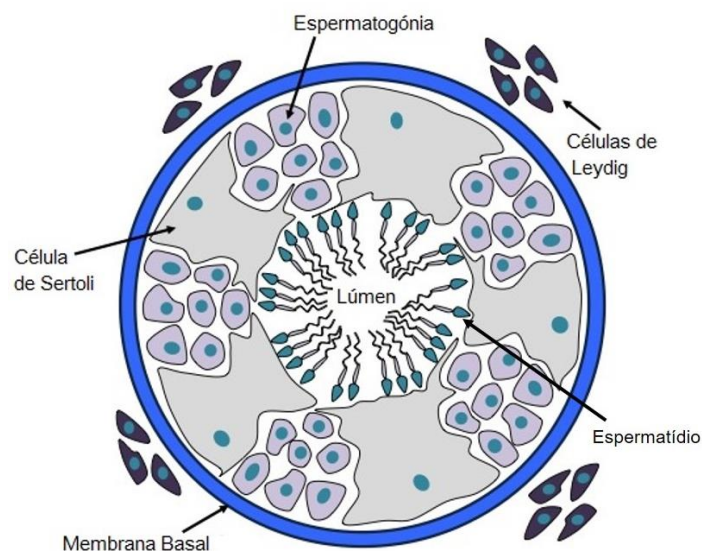


Fig. 1 - Esquema representativo da constituição celular dos túbulos seminíferos e do tecido intertubular. Dentro dos túbulos seminíferos, perto da membrana basal, localizam-se as espermatogónias, que ao longo de um processo de diferenciação (espermatogénese) irão dar origem aos espermatídios. As células de Sertoli, como acompanham todo a espermatogénese, estendem-se desde a membrana basal até ao lúmen. Quanto às células de Leydig, estas encontram-se no tecido intertubular. Adaptado de: <http://studentblogs.med.ed.ac.uk/reproductive-systems-group-4/sertoli-cell-differentiation-and-function/>, acedido a 10/11/2015

Para que haja uma produção ótima de espermatozoides, os testículos têm de estar a uma temperatura mais baixa que a temperatura corporal do indivíduo (Campbell, 2008). Assim, o escroto, que corresponde a uma bolsa de pele e músculo, tendo a função de suportar os testículos, é também responsável por manter a temperatura dos testículos cerca de 2°C abaixo da temperatura da cavidade abdominal (Campbell, 2008).

Após a formação dos espermatozoides nos túbulos seminíferos dos testículos, estes passam para o epidídimo (Figura 3; Campbell, 2008). Durante esta etapa, os espermatozoides completam a sua maturação, passam a ter motilidade e tornam-se mais resistentes ao pH e à temperatura, porém a capacidade de fertilizar um ócito só é adquirida quando estes estiverem expostos ao ambiente químico do Sistema Reprodutor Feminino (Fox, 2011).

### 1.3 O Espermatozoide

Um espermatozoide humano funcional é composto por três regiões principais: a cabeça, a peça intermédia e a cauda (Figura 2; Fox, 2011; Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

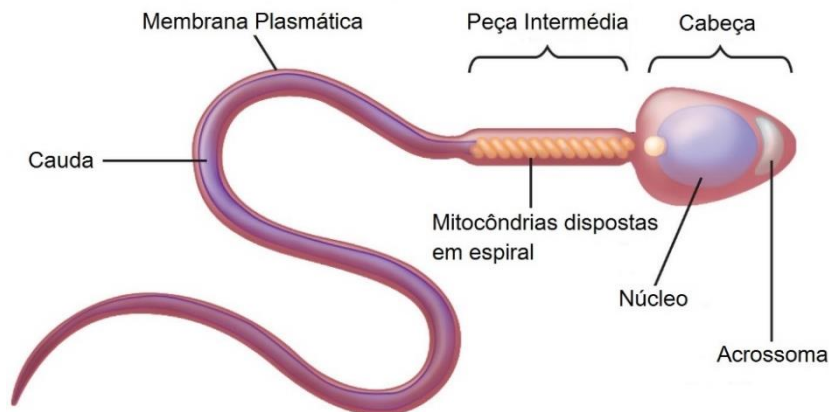


Fig. 2 - Ilustração do espermatozoide humano. Este é constituído por três partes principais: a cabeça, a peça intermédia e a cauda. Na cabeça localizam-se o núcleo e o acrossoma e na peça intermédia as mitocôndrias. Adaptado de: <http://www.biology.lifeeasy.org/95/what-is-the-structure-of-a-mature-human-sperm-cell>, acedido a 12/11/2015.

A cabeça do gâmeta masculino (Figura 2) contém um núcleo haploide ( $n=23$ ), protegido pelo invólucro nuclear, no qual proteínas de ligação ao ácido desoxirribonucleico (ADN) específicas do espermatozoide - as protaminas - estão em substituição maioritária das histonas (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Durante a espermiogénese (tema abordado na secção 1.4) ocorre a troca de histonas por protaminas, sendo estas responsáveis por uma melhor condensação da cromatina em relação às outras células do indivíduo (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). De facto, pensa-se que esta hipercondensação da cromatina leva a que processos como a transcrição estejam inativados (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Perto do núcleo, na região mais anterior do espermatozoide, encontra-se uma vesícula secretória denominada acrossoma (Figura 2; Fox, 2011). O acrossoma contém enzimas hidrolíticas que têm um papel importante na fertilização pois ajudam o espermatozoide a penetrar a zona pelúcida do ócito (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Após um estímulo externo, ocorre a libertação dos conteúdos do acrossoma - processo exocítico conhecido como reação acrossómica (tema abordado na secção 1.6; Abou-haila e Tulsiani, 2009; Ramalho-Santos *et al.*, 2007)

Relativamente à peça intermédia (Figura 2), esta estabelece a ligação entre a cabeça e a cauda, e consiste num número variável de mitocôndrias (entre 22 a 75) que estão dispostas em espiral à volta da porção anterior da cauda (Ramalho-Santos *et al.*, 2007; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). A principal função destas é a produção de energia, na forma de trifosfato de adenosina (ATP; Campbell, 2008; Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

Por último, a cauda do espermatozoide (Figura 2) é essencial para a motilidade deste, sendo constituída pelo axonema (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). O axonema tem um arranjo característico, no qual existe um par de microtúbulos central rodeado por nove

pares de microtúbulos, e ainda dineínas, que são proteínas motoras dependentes de ATP responsáveis pela propulsão da cauda (De Jonge e Barrat, 2006; Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

## 1.4 Espermatogénese, Espermiogénese e Espermiação

O processo de divisão e diferenciação de uma espermatogónia até à formação do espermatozoide designa-se de espermatogénese (Figura 3; Fox, 2011). A sua principal função é estabelecer e manter a produção diária de milhões de espermatozoides diferenciados, desde um pouco antes do início da puberdade até ao final da vida do homem (De Jonge e Barrat, 2006; Fox, 2011).

Este processo biológico ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos (Figura 3) e caracteriza-se por ser um evento altamente dinâmico e complexo, que envolve divisões mitóticas, meióticas, diferenciação e é regulado por várias hormonas gonadotrópicas, havendo a intervenção das células de Sertoli e de Leydig (Amaral *et al.*, 2013b).

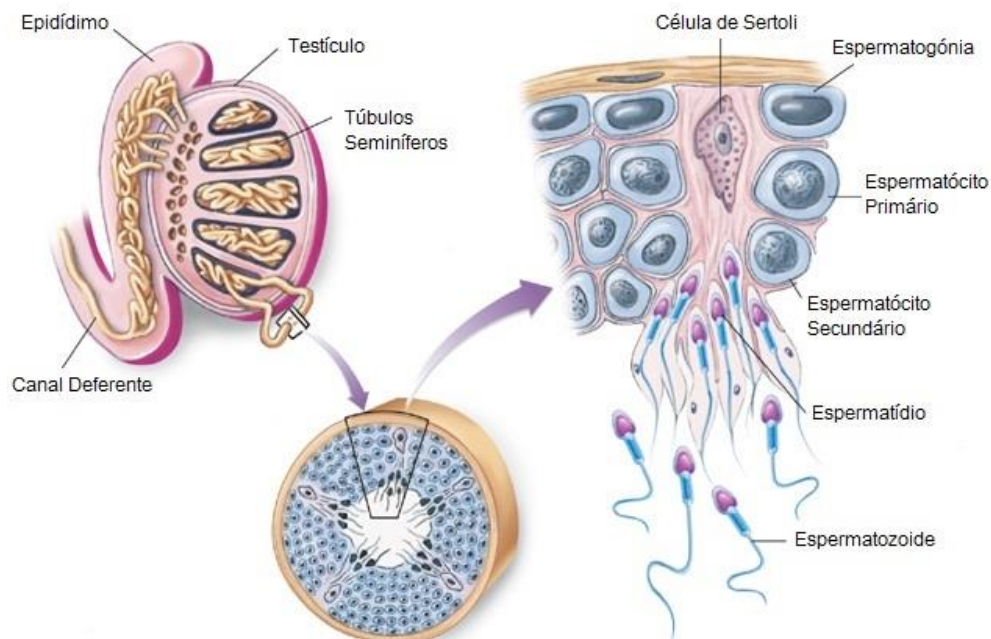


Fig. 3 - Ilustração da localização no Sistema Reprodutor Masculino dos túbulos seminíferos - local onde ocorre a espermatogénese - e esquema representativo das diferentes fases da mesma. A espermatogénese inicia-se com a divisão mitótica das espermatogónias, sendo que uma das duas células originadas, denominada por espermátócito sofrerá uma divisão meiótica. Os espermátócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica, originando os espermátócitos secundários. Os espermátócitos secundários, ao sofrerem a segunda divisão meiótica, dão origem aos espermátídeos. Adaptado de: <http://www.bio.utexas.edu/faculty/sjasper/Bio301L/ReviewExamIV.html>, acedido a 12/11/2015.

Durante o início do desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais, ao migrarem a partir do saco vitelínico para os testículos, passam a ser designadas de espermatogónias que são consideradas como células estaminais (Fox, 2011). Até ao nascimento, a divisão mitótica destas células é bloqueada na fase G<sub>1</sub> do

ciclo celular (Campbell, 2008). Quando o indivíduo atinge a puberdade inicia-se a espermatogénese propriamente dita (Fox, 2011). As espermatogónias são células diploides ( $n=46$ ) que se localizam na região mais periférica dos túbulos seminíferos, na proximidade com a membrana basal (Figura 3; De Jonge e Barrat, 2006; Fox, 2011). Tal disposição permite que estas células se encontrem perto dos vasos sanguíneos e do tecido intersticial, garantindo-se o fornecimento dos nutrientes necessários e ainda a regulação hormonal da espermatogénese (Fox, 2011).

Para que seja produzida uma quantidade considerável de espermatozoides durante a vida adulta, as espermatogónias duplicam-se, por divisão mitótica, sendo que uma das duas células originadas entra em processo de meiose sendo então denominada por espermatócito primário (Figura 3; De Jonge e Barrat, 2006). Desta forma, a espermatogénese pode ocorrer sem que haja uma diminuição abrupta do número de espermatogónias (Campbell, 2008). Após a primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários são originados os espermatócitos secundários (Figura 3), sendo estes haploides ( $n=23$ ; Fox, 2011). Por fim, os espermatócitos secundários, ao sofrerem a segunda divisão meiótica, dão origem aos espermatídios (Figura 3), que são haploides e, para cada cromossoma, têm apenas um cromátídeo (Campbell, 2008).

Os quatro espermatídios formados, provenientes da meiose de um espermatócito primário, apresentam os seus citoplasmas interconectados (Figura 3), ocorrendo assim a troca de substâncias entre os gametas e ainda uma sincronização da sua maturação (Fox, 2011).

A sequência de eventos que ocorre na espermatogénese é refletida no arranjo celular das paredes dos túbulos seminíferos (De Jonge e Barrat, 2006). Mais concretamente, as células germinativas estão dispostas segundo o grau de maturidade, estando as mais indiferenciadas na região basal e as mais diferenciadas mais próximas do lúmen do túbulo (Figuras 2 e 3; Fox, 2011).

Para que os espermatozoides sejam considerados como maduros, é necessário que ocorra a espermiogénese e a espermição (De Jonge e Barrat, 2006; Fox, 2011). Nestes processos os espermatídios, com os seus citoplasmas interconectados, são separados e ocorre a diferenciação destes em espermatozoides maduros, em células altamente especializadas, graças à participação das células de Sertoli (Fox, 2011).

Durante a espermiogénese, decorrem quatro eventos chave: a condensação da cromatina nuclear em cerca de um décimo do volume de um espermatídio imaturo; formação da vesícula acrossomal, através do Complexo de Golgi, e a sua ligação ao núcleo; o desenvolvimento das estruturas do flagelo (Holstein *et al.*, 2003) e a reorganização das mitocôndrias, sendo que algumas são perdidas e outras organizam-

se em estruturas tubulares alongadas que, posteriormente, são posicionadas em forma de espiral na região da peça intermédia (Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Ao longo deste processo, os espermátídios permanecem associados às células de Sertoli, via junções celulares, e ligados uns aos outros através de pontes citoplasmáticas (De Jonge e Barrat, 2006).

No final da espermiogénese ocorre a espermiação (De Jonge e Barrat, 2006). Neste evento, os espermatozoides deixam de estar interconectados e são libertados para o lúmen dos túbulos seminíferos, migrando até ao epidídimo onde irão continuar o seu processo de maturação (Figura 3; De Jonge e Barrat, 2006). Durante esta migração, o excesso de citoplasma é removido, formando-se o corpo residual que, juntamente com as mitocôndrias que foram perdidas, será fagocitado pelas células de Sertoli (De Jonge e Barrat, 2006; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Porém, quando não há esta remoção do excesso de citoplasma, devido a anomalias que possam ter ocorrido no processo de maturação, o espermatozoide é considerado como imaturo e não é capaz de, posteriormente, fertilizar o oócito (Tvrdá *et al.*, 2011). Chegando ao epidídimo, os espermatozoides são alvo de modificações pós-traducionais e da adição de proteínas secretadas pelo epitélio epidimal (Buffone *et al.*, 2013). Tais eventos permitem que os espermatozoides se tornem células altamente especializadas, competentes, com motilidade progressiva e ainda capazes de suportar o passo de maturação final (processo denominado por capacitação) que ocorrerá quando estes se encontrarem no Trato Reprodutor Feminino, após a ejaculação (tema abordado na secção 1.5; Buffone *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 Regulação Hormonal da Espermatogénese

A regulação hormonal da espermatogénese é dependente do eixo hipotálamo-hipófise, sendo que os vários mensageiros hormonais atuam através das vias: endócrina, parácrina e autócrina (Amaral *et al.*, 2013b; Fox, 2011).

Do ponto de vista endócrino e parácrino, a espermatogénese é controlada pela secreção da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH), secretada pelo hipotálamo, que, por sua vez, estimula a secreção das hormonas folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), pela hipófise (Amaral *et al.*, 2013b).

No caso da LH, esta atua nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona, que por sua vez irá exercer um retrocontrolo negativo sobre o hipotálamo e a hipófise (Amaral *et al.*, 2013b). A testosterona é, de longe, o principal androgénio secretado nos testículos de um indivíduo adulto (Fox, 2011). Esta hormona é necessária para o normal desenvolvimento dos espermatozoides, uma vez que ativa genes nas



células de Sertoli que promovem a diferenciação das espermatogónias, permitindo assim a continuação do processo da espermatogénese (De Jonge e Barrat, 2006).

## 1.5 Capacitação

Após a ejaculação, os espermatozoides ainda não são capazes de fertilizar o oócito (De Jonge e Barrat, 2006). Estudos levados a cabo por Chang e Austin, em 1951, provaram que é necessário que os espermatozoides permaneçam um certo período de tempo no trato reprodutor feminino para que se tornem células funcionalmente competentes (Abou-haila e Tulsiani, 2009; De Jonge e Barrat, 2006). Assim surgiu o termo capacitação que se refere às múltiplas modificações bioquímicas e fisiológicas das quais os espermatozoides são alvo à medida que se deslocam pelo Trato Reprodutor Feminino (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Através destas modificações, o gâmeta masculino adquire um movimento hiperativo - permite uma motilidade mais veloz, sendo fundamental para a fecundação - passando a ser capaz de reconhecer e de se ligar à zona pelúcida do oócito, sofrer a reação acrossómica e fundir-se com o oócito (Abou-haila e Tulsiani, 2009; Lamirande *et al.*, 1997).

Antes da capacitação propriamente dita ocorrer, é necessário que ocorram certas alterações preparatórias, tais como: a remoção de proteínas/glicoproteínas do plasma seminal que se encontram adsorvidas à superfície dos espermatozoides, e a reorganização e modificação das moléculas que fazem parte da membrana plasmática dos espermatozoides (Abou-haila e Tulsiani, 2009).

O evento que inicia a capacitação é o efluxo de colesterol a partir da membrana plasmática (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Neste passo, a albumina, proteína que existe nas secreções do Trato Reprodutor Feminino, toma um papel de extrema importância (Abou-haila e Tulsiani, 2009; Signorelli *et al.*, 2012). Pensa-se que esta proteína inicia a capacitação ao facilitar o efluxo de esteróis, tais como o colesterol, a partir da membrana plasmática do espermatozoide (Signorelli *et al.*, 2012). Por sua vez, este efluxo provoca alterações no potencial de membrana, bem como, um aumento na permeabilidade e na fluidez da mesma, permitindo o influxo de iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e bicarbonato (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Seguidamente, é iniciada a cascata de sinalização que inclui a seguinte sequência de eventos: ativação da adenil ciclase solúvel (SACY) e a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP); estimulação da proteína cinase A (PKA); e fosforilação em resíduos de tirosina de várias proteínas que são relevantes para os subsequentes processos que ocorrem no espermatozoide (Signorelli *et al.*, 2012). É através da fosforilação de tirosinas em proteínas do flagelo que resulta o movimento hiperativo dos espermatozoides (Abou-haila e Tulsiani, 2009). A presença destas

funciona ainda como marcador ou indicador de capacitação em estudos que envolvam espermatozoides (Abou-haila e Tulsiani, 2009).

A capacitação pode também ser recriada *in vitro*. Para tal, é necessário incubar os espermatozoides num meio quimicamente definido suplementado com: albumina do soro bovino, glucose e piruvato para que haja um fornecimento de energia, eletrólitos tais como bicarbonato e  $\text{Ca}^{2+}$  e um aceitador de colesterol (Abou-haila e Tulsiani, 2009; Buffone *et al.*, 2013).

## 1.6 Reação Acrossómica

Para que o espermatozoide penetre a zona pelúcida do oócito e, consequentemente o fertilize, é necessário que ocorra a reação acrossómica (Florman *et al.*, 2008). De facto, através de estudos clínicos, provou-se que anomalias na reação acrossómica estão associadas a casos de infertilidade (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Esta reação é levada a cabo pelo acrossoma que se define como uma vesícula secretora, derivada do Complexo de Golgi, com membrana interna e externa, localizada na parte anterior da cabeça do espermatozoide (Abou-haila e Tulsiani, 2009; Gupta e Bhandari, 2011).

Existem vários compostos que podem induzir a reação acrossómica, tais como fluído folicular, progesterona, albumina, enzimas hidrolíticas (tais como proteases), ácido hialurónico (Abou-haila e Tulsiani, 2009) e, principalmente, glicoproteínas da zona pelúcida do oócito, nomeadamente a proteína ZP3 (Gupta e Bhandari, 2011). Antes da ligação do espermatozoide à zona pelúcida, e do contacto com estes compostos, os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no gâmeta masculino mantêm-se baixos, enquanto que a concentração deste ião no meio extracelular é muito mais elevada (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Após a ligação irreversível do espermatozoide capacitado com o gâmeta feminino, ocorre, no espermatozoide, a ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que provocam um aumento de iões divalentes e de outros mensageiros secundários tais como o cAMP, o 1,2-diacylglicerol (DAG) e o 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3; Abou-haila e Tulsiani, 2009; Florman *et al.* 2008). O incremento nos níveis de cAMP leva à ativação de cinases dependentes de cAMP, de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfolípidos (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Por outro lado, este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, juntamente com outros mensageiros secundários, iniciam uma cascata de eventos de sinalização que conduzem a um aumento do pH intracelular, à fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma e à exocitose dos conteúdos do acrossoma (Abou-haila e Tulsiani, 2009).

Em termos morfológicos, a reação acrossómica ocorre em diversos passos (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Primeiro dá-se a ligação da proteína ZP3 da zona pelúcida

do oócito a um recetor membranal do espermatozoide, o que causa o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Florman *et al.*, 2008). Em segundo lugar, ocorre a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma em vários locais (Abou-haila e Tulsiani, 2009). Seguidamente, a fusão das membranas provoca a formação de vesículas e a libertação do conteúdo do acrossoma, sendo este um passo lento (Abou-haila e Tulsiani, 2009). O conteúdo do acrossoma corresponde a enzimas com ação hidrolítica, tais como proteínases e glicohidrolases que conduzem à lise da zona pelúcida, permitindo, juntamente com o movimento hiperativo do espermatozoide, a penetração do espermatozoide no oócito (Abou-haila e Tulsiani, 2009).

## 1.7 Infertilidade Masculina e Espécies Reativas de Oxigénio e de Nitrogénio

### 1.7.1 Espécies Reativas de Oxigénio e de Nitrogénio e o Espermatozoide

Os radicais livres são intermediários químicos que possuem pelo menos um eletrão desemparelhado, apresentando elevada reatividade (De Jonge e Barrat, 2006). Os radicais livres de oxigénio, que dão origem e constituem a maioria das espécies reativas de oxigénio (ROS), são metabolitos derivados da redução do oxigénio e que incluem: radicais livres, tais como o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), e moléculas neutras como o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sendo estas as ROS mais relevantes para o espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2014; De Jonge e Barrat, 2006). Apesar de as ROS serem as espécies reativas mais relevantes fisiologicamente e mais abundantes, também existem as espécies reativas de nitrogénio (RNS), consideradas como uma subclasse das ROS, e que incluem o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ) e o óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ; Buzadzic *et al.*, 2014; Du Plessis *et al.*, 2010a).

Num contexto biológico, as ROS e algumas RNS, tais como  $\text{ONOO}^{\cdot-}$ , são formadas como um subproduto natural proveniente do metabolismo normal do oxigénio (Agarwal *et al.*, 2014). Apesar das ROS e das RNS estarem muitas vezes associadas a um papel negativo, dado que em concentrações elevadas provocam dano celular, estas são na verdade essenciais para o correto funcionamento das células. No caso do espermatozoide, as ROS/RNS intervêm em processos fisiológicos altamente relevantes para a função do gâmeta masculino (Figura 4; Agarwal *et al.*, 2014).

Porém, os níveis de ROS/RNS podem aumentar dramaticamente quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS/RNS e a sua neutralização/metabolização, processo denominado por *stress oxidativo* (Figura 4; Agarwal *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2013a). Existem diversos fatores que contribuem para que haja uma produção excessiva de ROS/RNS no aparelho reprodutor masculino e que podem afetar o espermatozoide (Agarwal *et al.*, 2014; Buzadzic *et al.*, 2014). Entre eles existem fatores exógenos ao indivíduo, tais como a radiação, a temperatura, toxinas, o consumo de álcool e tabaco; e fatores endógenos: a presença de espermatozoides imaturos e algumas patologias, tais como a hiperglicemia, o síndrome anatômico de varizes escrotales (varicocelo) e a leucocitospermia (Figura 4; Agarwal *et al.*, 2014; Treulen *et al.*, 2015). Nos fatores endógenos inclui-se ainda a própria produção, no espermatozoide, de ROS pela mitocôndria (A. Amaral *et al.*, 2013) e pela isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5; Musset *et al.*, 2012), e ainda de RNS pelas isoformas da NO sintase (NOS; Buzadzic *et al.*, 2014).

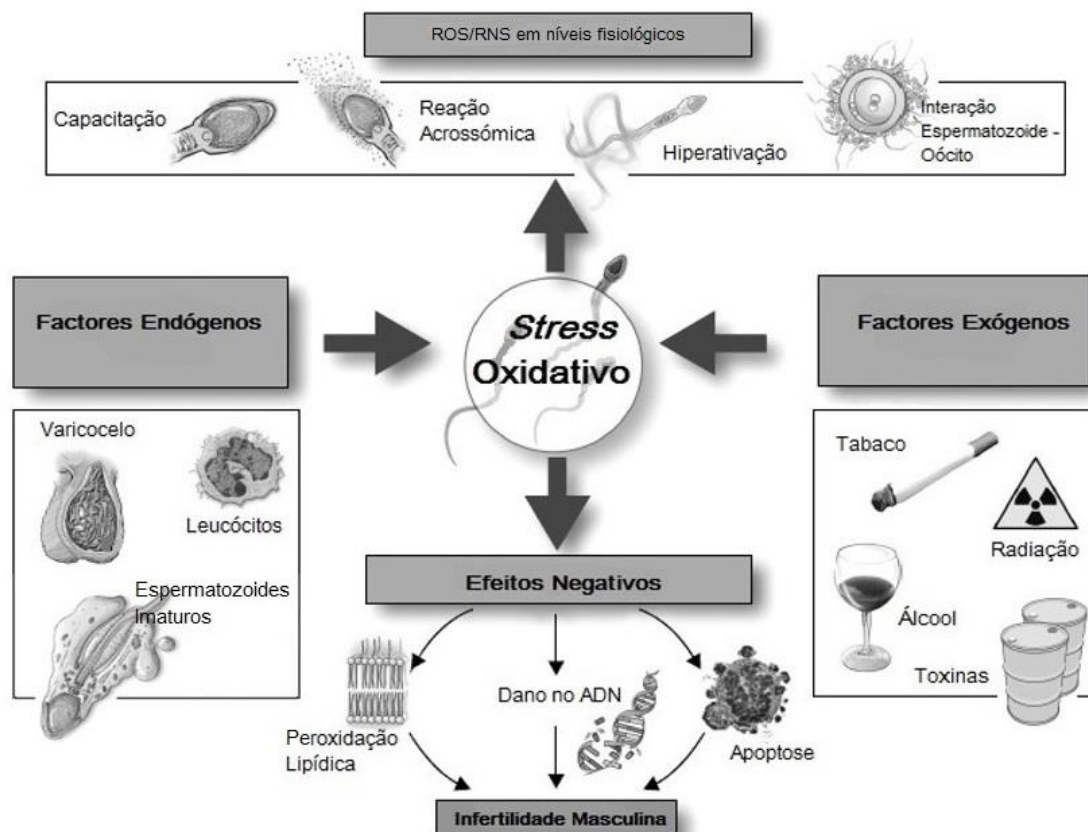


Fig. 4 - O *stress oxidativo* e o espermatozoide. Em níveis fisiológicos, o *stress oxidativo*, na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), é essencial para diversos processos. No entanto, os níveis de ROS/RNS podem aumentar devido a fatores exógenos e endógenos, levando a uma série de efeitos negativos no espermatozoide, conduzindo, em último caso, à infertilidade masculina. Adaptado de Agarwal *et al.*, 2014.

### 1.7.1.1 Fontes Endógenas de ROS e de RNS

#### 1.7.1.1.1 NOX5

Uma das principais fontes de ROS no espermatozoide humano é o sistema NADPH oxidase (NOX; Agarwal *et al.*, 2014). Através da NOX há a produção de  $\bullet\text{O}_2^-$ , segundo a seguinte equação:



(NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido de fosfato; H<sup>+</sup>: próton ou íon hidrogénio)

Recentemente foi descrita uma isoforma de NOX denominada NOX5 (Figura 5), presente na membrana plasmática do espermatozoide humano (Ghani *et al.*, 2013; Musset *et al.*, 2012). A produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  pela NOX5 é dependente da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que o influxo deste é regulado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 5; Musset *et al.*, 2012; Treulen *et al.*, 2015).

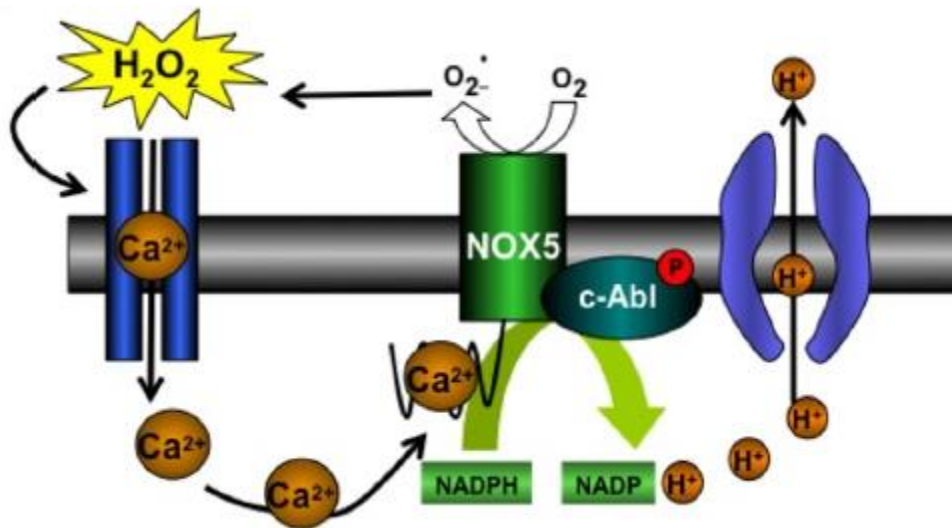


Fig. 5 - Representação esquemática da interação entre a isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5) com o íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é regulado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por sua vez, o  $\text{Ca}^{2+}$  ao ligar-se à NOX5, ativa-a, ocorrendo a produção do radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Adaptado de Musset *et al.*, 2012.

#### 1.7.1.1.2 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos, existentes na maioria das células eucarióticas, que têm um papel muito importante na síntese de ATP, na homeostasia, na regulação de vias de sinalização, na produção de ROS e na morte celular programada - apoptose (Fogg *et al.*, 2011; Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

Estes organelos são compostos por quatro compartimentos bem definidos e interconectados: a membrana mitocondrial externa, a membrana mitocondrial interna, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial (Figura 6; A. Amaral *et al.*, 2013). No

caso do espermatozoide humano, as mitocôndrias, localizadas na peça intermédia, são as principais responsáveis pela produção de ATP que é necessário para a motilidade e ainda para eventos celulares que intervêm na capacitação, hiperactivação e na reacção acrossómica (Ramalho-Santos *et al.*, 2009). No entanto, sabe-se que o ATP pode ser também proveniente da glicólise, sendo que o espermatozoide pode recorrer tanto a esta via como às mitocôndrias, dependendo da disponibilidade dos substratos (Du Plessis, 2015; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Esta produção de ATP, por parte das mitocôndrias, é um processo aeróbico conhecido como fosforilação oxidativa (Lehninger, 2008). Neste processo, substratos resultantes da oxidação de hidratos de carbono, lípidos e proteínas sob a forma de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e de succinato são oxidados pelos complexos da cadeia transportadora de eletrões (CTE) localizados na membrana mitocondrial interna (Figura 6; Lehninger, 2008). Por sua vez, a energia libertada nestas oxidações, que ocorrem na CTE, é utilizada para a síntese de ATP (Lehninger, 2008).

A CTE é composta por cinco complexos multiproteicos: Complexo I ou NADH Desidrogenase, Complexo II ou Succinato Desidrogenase, Complexo III ou Citocromo C Reductase, Complexo IV ou Citocromo C Oxidase e a ATP Sintase, localizados na membrana mitocondrial interna, e dois transportadores de eletrões, a coenzima Q (ou ubiquinona - Q) e o citocromo c (Figura 6; Lehninger, 2008; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Neste evento, os eletrões de alta energia provenientes da NADH e do succinato são fornecidos aos Complexos I e II, sendo transferidos para a coenzima Q que os conduz até ao Complexo III (Figura 6; Lehninger, 2008). Por sua vez, o Complexo III envia os eletrões para o citocromo c que os leva até ao Complexo IV (Figura 6), onde aqui os eletrões irão reduzir o oxigénio molecular a água (Lehninger, 2008). A energia libertada a partir do transporte dos eletrões através destes complexos é utilizada para bombear prótons da matriz para o espaço intermembranar (Figura 6), criando-se um gradiente eletroquímico (Lehninger, 2008). Posteriormente, os prótons regressam à matriz mitocondrial através da ATP Sintase que utiliza a energia armazenada no gradiente eletroquímico para produzir ATP a partir da adenosina difosfato (ADP) e do fosfato inorgânico (Pi; Figura 6; A. Amaral *et al.*, 2013; Bayir *et al.*, 2008).

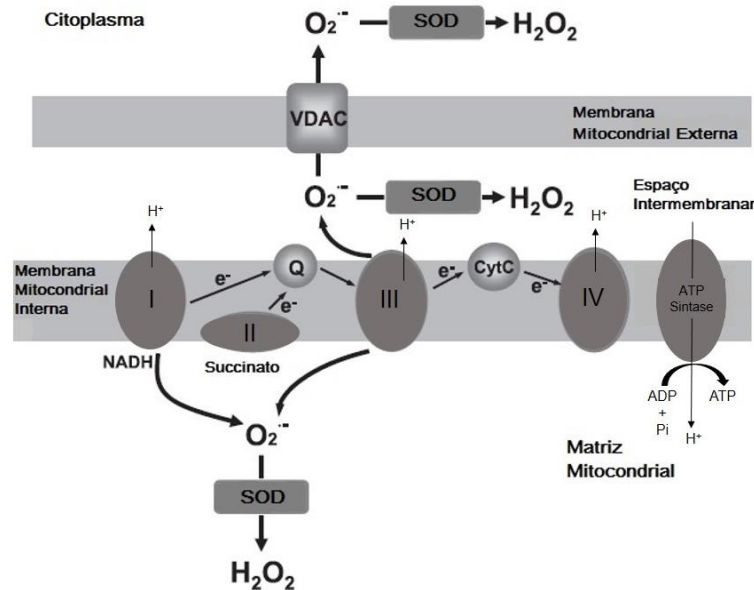


Fig. 6 - A cadeia transportadora de elétrons (CTE) e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria. Na CTE os elétrons provenientes da nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e do succinato são fornecidos aos Complexos I e II, sendo transferidos para a coenzima Q que os conduz até ao Complexo III. Por sua vez, o Complexo III envia os elétrons para o citocromo c que os leva até ao Complexo IV. Durante este transporte pode haver produção de ROS, nomeadamente anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ao nível dos Complexos I e III. O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é libertado para a matriz mitocondrial e/ou para o espaço intermembranar, podendo ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Alguns do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzido pode ainda passar para o citosol através de um canal aniônico dependente da voltagem (VDAC) localizado na membrana mitocondrial externa. Uma vez no citosol, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação de uma SOD citosólica. Adaptado de Zhang e Gutterman, 2007.

Quanto à produção de ROS na mitocôndria, sabe-se que cerca de 1 a 5 % do oxigénio molecular é reduzido de uma forma incompleta a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que, por sua vez, poderá dar origem a outras ROS através de reações enzimáticas ou não enzimáticas (Henkel, 2011). A CTE gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ao nível dos complexos I e III (Figura 6; Henkel, 2011). No caso do Complexo III, este produz  $\text{O}_2^{\bullet-}$  através da auto-oxidação do radical semiquinona ( $\text{Q}^{\bullet}$ ), formado durante o ciclo Q neste complexo (Zhang e Gutterman, 2007). Este complexo tem a capacidade de libertar  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para ambos os lados da membrana mitocondrial interna (Figura 6; Zhang e Gutterman, 2007). Em relação ao Complexo I, o mecanismo pelo qual há produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ainda não está claro, no entanto crê-se que poderá ser devido ao transporte reverso dos eletrões a partir do Complexo II aquando a oxidação do succinato (Zhang e Gutterman, 2007).

Uma vez formado, quer na matriz quer no espaço intermembranar, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  não consegue difundir-se pelas membranas mitocôndrias dado que apresenta carga (Fogg *et al.*, 2011). No entanto, este pode ser transportado através da membrana mitocondrial externa até ao citosol, através de um canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) mitocondrial (Figura 6; Fogg *et al.*, 2011). Por outro lado, na mitocôndria, esta ROS pode ser convertida em  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) existente na matriz mitocondrial e no espaço intermembranar (Figura 6; Fogg *et al.*, 2011). Este é o mecanismo mais relevante para a saída do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  da mitocôndria dado que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é

desprovido de carga, movimentando-se, facilmente, através das membranas (Henkel, 2011). No citosol, o  $\bullet\text{O}_2^-$  pode ser igualmente convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  mas por ação de uma SOD citosólica (Figura 6; Fogg *et al.*, 2011).

#### 1.7.1.1.3 Espermatozoides Imaturos e Leucócitos

No epidídimo e após a ejaculação (Gil-Guzman *et al.*, 2001), os espermatozoides funcionais estão em contacto com os espermatozoides imaturos, que apresentam retenção de citoplasma (Agarwal *et al.*, 2003). Segundo um estudo levado a cabo por Gil-Guzman e colaboradores (2001), verificou-se que os espermatozoides imaturos produzem ROS, possivelmente ao nível da membrana plasmática, através da NOX5 (Agarwal *et al.*, 2014). As ROS, por sua vez, causam dano oxidativo aos espermatozoides funcionais que se encontram na vizinhança dos imaturos, diminuindo assim a qualidade espermática (Gil-Guzman *et al.*, 2001; Tvrdá *et al.*, 2011).

Em relação ao líquido seminal, os leucócitos contaminantes são a principal fonte de ROS, chegando a produzir cerca de 1000 vezes mais ROS do que os espermatozoides (Henkel, 2011). As ROS são produzidas pelos leucócitos no processo de fagocitose necessário para matar as bactérias que são fagocitadas (Ford, 2004). Segundo a OMS, concentrações de leucócitos superiores a  $10^6$  leucócitos por mL de ejaculado correspondem a uma situação de leucocitospermia (Henkel *et al.*, 2005). Tal situação pode ser potenciada por infeções bacterianas e inflamações podendo vir a ter um efeito adverso na fertilidade (Henkel, 2011). Dentro das ROS produzidas pelos leucócitos, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é persistente e pode penetrar pela membrana plasmática, danificando a integridade do ADN. Quanto às ROS que não permeiam a membrana, tais como  $\bullet\text{O}_2^-$  e  $\bullet\text{OH}$ , estas irão oxidar os lípidos membranares (Henkel *et al.*, 2005). Os leucócitos produzem igualmente RNS, tais como o  $\text{NO}\bullet$  (Cassina *et al.*, 2015).

#### 1.7.1.1.4 NO Sintase

No que toca às RNS, nomeadamente o  $\text{NO}\bullet$ , este é considerado como uma molécula sinalizadora num contexto biológico (Buzadzic *et al.*, 2014). O  $\text{NO}\bullet$  é sintetizado em praticamente todas as células dos mamíferos, através da oxidação da L-arginina em L-citrulina por enzimas da família da NOS (Lampiao e Du Plessis, 2008).

Existem três isoformas da NOS: a neuronal (nNOS), que foi originalmente descrita no tecido neuronal; a endotelial (eNOS), que foi inicialmente identificada em células endoteliais e por fim, a NOS induzível (iNOS), originalmente descrita em macrófagos (Buzadzic *et al.*, 2014). A ativação das isoformas da NOS constitutiva - nNOS e eNOS - é dependente da calmodulina ligada ao  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que a ativação



da iNOS é praticamente independente desta (Herrero e Gagnon, 2001). O NO• exerce os seus efeitos através de dois tipos diferentes de vias de sinalização: as dependentes de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e as independentes deste - vias clássica e não clássica, respetivamente (Buzadzic *et al.*, 2014). Quando o NO• se encontra em concentrações elevadas, a via de sinalização independente de cGMP tende a ser preponderante e esta ocorre através de modificações pós-traducionais de proteínas alvo, isto é, ocorre S-nitrosilação, S-glutationilação e nitração de tirosinas (Buzadzic *et al.*, 2014).

Em relação ao espermatozoide humano, este expressa as três isoformas da NOS localizadas na cabeça e/ou na peça intermédia (Buzadzic *et al.*, 2014). A produção de NO• a níveis fisiológicos é extremamente importante para a regulação da motilidade dos espermatozoides, sendo ainda importante na capacitação, na aquisição da motilidade hiperactivada, na reação acrossómica e na interação entre o gâmeta masculino e o ócito (Buzadzic *et al.*, 2014; Lewis *et al.*, 1996). Porém, uma situação de *stress* oxidativo, na qual ocorre uma produção excessiva de NO•, é altamente prejudicial para o espermatozoide (Du Plessis *et al.*, 2010a).

#### 1.7.1.2 Defesas Antioxidantes

De forma a manter os níveis de ROS na gama fisiológica, o organismo desenvolveu defesas antioxidantes (Tvrdá *et al.*, 2011). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, e atuam de modo a eliminar as ROS/RNS ou a inibir a sua produção (Agarwal *et al.*, 2014).

No que toca ao espermatozoide, este não possui muitos antioxidantes devido ao reduzido volume de citoplasma (Koppers *et al.*, 2008). No entanto, a membrana plasmática possui alguns antioxidantes não enzimáticos como transferrina, ceruloplasmina, vitaminas E e A (Tvrdá *et al.*, 2011). Para além disso, esta possui enzimas antioxidantes como a catalase, a SOD e a glutathione peroxidase na peça intermédia (De Lamirande e Gagnon 1995; Tvrdá *et al.*, 2011).

No entanto, não é só o espermatozoide que apresenta defesas antioxidantes. De facto, todo o Trato Reprodutor Masculino fornece aos espermatozoides secreções que contêm antioxidantes extracelulares (Aitken e Koppers, 2011). No testículo existe a produção de antioxidantes não enzimáticos tais como: melatonina, citocromo c, zinco e vitaminas C e E (Aitken e Roman, 2008). Quanto ao epidídimo, as células de Sertoli e as germinativas produzem a SOD convencional e ainda uma SOD extracelular (Aitken e Koppers, 2011; Aitken e Roman, 2008). O líquido seminal, que é composto por secreções da vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral, é rico em substâncias

antioxidantes como SOD, glutathione peroxidase (De Lamirande e Gagnon, 1995), vitaminas E, C e A, ácido úrico, albumina, piruvato, taurina, hipotaurina, glutathione, ubiquinol,  $\alpha$ -tocoferol (Sanocka e Kurpisz, 2004; Tvrdá *et al.*, 2011).

### 1.7.1.3 Efeitos das ROS/RNS no Espermatozoide

#### 1.7.1.3.1 Efeitos Positivos

Hoje em dia sabe-se que, no espermatozoide, níveis fisiológicos de ROS/RNS são essenciais na regulação da capacitação e da reação acrossómica - dois processos necessários para que os espermatozoides adquiram potencial de fertilização (Buzadzic *et al.*, 2014). Além disso, já foi provado que as ROS/RNS estimulam a motilidade hiperativa dos espermatozoides, bem como a ligação à zona pelúcida (Buzadzic *et al.*, 2014; Makker *et al.*, 2009). Como tal, as ROS/RNS funcionam como mensageiros secundários, regulando passos cruciais para a fertilização (Buzadzic *et al.*, 2014).

Dentro das ROS/RNS, o  $\text{NO}^\bullet$  (Buzadzic *et al.*, 2014), o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  são essenciais para a regulação da capacitação e da reação acrossómica (Kothari *et al.*, 2010; Makker *et al.*, 2009). Tanto o  $\text{NO}^\bullet$  como o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  são produzidos no início da capacitação e controlam o aumento dos níveis de cAMP, a maioria das fosforilações em resíduos de serina/treonina dos substratos da PKA, o aumento da fosforilação em resíduos de tirosina das proteínas do flagelo e a nitratação em resíduos de tirosina de proteínas (Buzadzic *et al.*, 2014). Quanto ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este promove a fosforilação em resíduos de tirosina das proteínas do flagelo, uma vez que leva ao aumento da atividade das cinases de tirosinas (Kothari *et al.*, 2010). Graças a este aumento dos níveis de cAMP, o movimento hiperativo dos espermatozoides é promovido (Makker *et al.*, 2009). De facto, resultados obtidos em experiências realizadas *in vitro* sugerem que o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e o  $\text{NO}^\bullet$ , este último a concentrações inferiores a 1  $\mu\text{M}$  (Buzadzic *et al.*, 2014), promovem a hiperactivação dos espermatozoides (Kothari *et al.*, 2010). Similarmente à capacitação, a reação acrossómica também é estimulada pelos ROS e  $\text{NO}^\bullet$  que também promovem um aumento dos níveis de cAMP, permitindo que o evento exocítico se inicie (Buzadzic *et al.*, 2014).

Quanto à ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito, esta é potenciada pelas ROS, e em particular pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que a peroxidação lipídica causada por níveis relativamente baixos destas levam à modificação da membrana plasmática, facilitando assim a adesão do espermatozoide ao oócito (Kothari *et al.*, 2010; Makker *et al.*, 2009).

#### 1.7.1.3.2 Efeitos Negativos

Um dos principais efeitos negativos dos ROS detém-se com os danos no ADN (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken e Koppers, 2011). Hoje em dia sabe-se que a infertilidade masculina está muitas vezes associada a elevadas taxas de dano no ADN do espermatozoide (Aitken e Koppers, 2011). Se a extensão do dano no ADN for pequena, o espermatozoide consegue repará-lo e, além disso, o ócito também é capaz de reparar danos (Makker *et al.*, 2009). Porém, se o dano no ADN for muito extenso, poderá ocorrer apoptose e fragmentação do embrião (Makker *et al.*, 2009). Assim sendo, para que haja uma correta transmissão da informação genética paterna é essencial que a integridade do ADN do espermatozoide se mantenha. Ainda assim, a estrutura típica da cromatina do espermatozoide, na qual as cadeias de ADN permanecem hipercondensadas e organizadas, permite que a cromatina esteja protegida do dano oxidativo, ao torná-la particularmente resistente ao dano no ADN (Aitken e Koppers, 2011). Contudo, quando existe uma fraca compactação e uma protaminação incompleta da cromatina, o ADN torna-se mais vulnerável ao *stress* oxidativo (Agarwal *et al.*, 2014). Como consequência, surgem modificações de bases, deleções, ligações cruzadas, rearranjos nos cromossomas e quebra de uma ou das duas cadeias (Agarwal *et al.*, 2014; Tvrdá *et al.*, 2011). Além disso, o *stress* oxidativo pode ainda provocar mutações pontuais e polimorfismos que podem reduzir a qualidade dos espermatozoides (Tvrdá *et al.*, 2011). Dentro das várias ROS, o  $H_2O_2$  é apontado como o possível responsável pelo dano no ADN, visto que esta molécula não possui carga e apresenta um tamanho reduzido, podendo facilmente sair da peça intermédia, local onde é produzido nas mitocôndrias, e entrar no núcleo do espermatozoide (Henkel *et al.*, 2005; Henkel, 2011; Treulen *et al.*, 2015).

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um fenómeno fisiológico caracterizado por modificações morfológicas e bioquímicas que conduzem à morte das células de uma maneira controlada (Agarwal *et al.*, 2014). No contexto normal do Sistema Reprodutor Masculino, a apoptose é útil para a remoção de células germinativas anormais e previne a produção exagerada destas durante a espermatogénese (Tvrdá *et al.*, 2011). No processo da apoptose estão implicadas as vias intrínseca e extrínseca (Aitken e Koppers, 2011). No caso da via intrínseca, esta é iniciada quando a célula não está em homeostasia, como por exemplo quando existe um excesso de ROS (Aitken e Koppers, 2011; Lehninger, 2008). Quando os níveis de ROS aumentam ocorre dano no ADN e as membranas mitocondriais interna e externa são quebradas, libertando-se citocromo c, que por sua vez ativa as caspases 9 e 3, que irão exercer a sua função de proteases, levando à morte celular (Agarwal *et al.*, 2014;

Tvrda *et al.*, 2011). O  $H_2O_2$  é a principal ROS indutora da apoptose no espermatozoide (Aitken e Koppers, 2011).

A membrana plasmática do espermatozoide humano é marcadamente diferente, em termos de composição lipídica, da membrana plasmática das células somáticas do indivíduo (Agarwal *et al.*, 2014). Esta contém elevados níveis de lípidos na forma de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) - com várias ligações duplas - particularmente em ácido docosahexaenóico (DHA), que apresenta seis ligações duplas carbono-carbono (Sanocka e Kurpisz, 2004; Tvrda *et al.*, 2011). O DHA tem um papel importante na regulação da fluidez da membrana (Sanocka e Kurpisz, 2004). Ao longo do processo de maturação dos espermatozoides, o conteúdo em DHA vai diminuindo, assim, espermatozoides que sejam imaturos têm níveis muito elevados de DHA (Sanocka e Kurpisz, 2004). Um aumento nos níveis de ROS, em particular  $\bullet OH$ , originado a partir do  $H_2O_2$ , pode-se traduzir na peroxidação lipídica da membrana plasmática do espermatozoide (Henkel, 2011). Este processo é considerado como autocatalítico, de autopropagação e tem como alvo os PUFA (Sanocka e Kurpisz, 2004), como tal, pacientes com níveis de DHA muito altos serão mais suscetíveis à peroxidação lipídica provocada pelas ROS (Agarwal *et al.*, 2014; Sanocka e Kurpisz, 2004). A peroxidação lipídica apresenta três fases: iniciação, propagação e terminação (Henkel, 2011). Na iniciação, o  $\bullet OH$  ataca os átomos de carbono adjacentes às ligações duplas dos PUFA, formando-se um radical lipídico e água (Henkel, 2011). Ao reagir com o oxigénio molecular, o radical lipídico forma um radical peróxido lipídico (Sanocka e Kurpisz, 2004). Seguidamente, na fase da propagação, o radical peróxido lipídico reage com outros PUFA que estão na sua proximidade, dando origem a outro radical lipídico que, por sua vez, irá formar outra molécula de peróxido lipídico ao reagir com o oxigénio molecular (Henkel, 2011). Por último, quando um radical lipídico reage com outro, origina-se uma molécula estável, uma vez que se formou uma ligação covalente entre os eletrões livres, terminando assim a peroxidação lipídica (Henkel, 2011). Neste processo obtêm-se produtos citotóxicos, mutagénicos e genotóxicos (Henkel, 2011). No geral, a peroxidação lipídica no espermatozoide conduz a uma perda de cerca de 60% dos PUFA membranares, havendo, conseqüentemente, perda da fluidez membranar e a uma redução da atividade de enzimas e recetores membranares e do número de canais iónicos (Agarwal *et al.*, 2014). Assim, os mecanismos celulares necessários para a fertilização ficam inibidos (Tvrda *et al.*, 2011).

O potencial *redox* mede a tendência que uma dada espécie química tem em adquirir eletrões e, conseqüentemente se reduzir (Chang, 2005). Compostos que tenham um potencial *redox* negativo, têm uma baixa afinidade para eletrões,

funcionando como agentes redutores, que sofrem oxidação (Baker e Aitken, 2004). Pelo contrário, compostos com um potencial *redox* positivo, têm uma elevada afinidade para eletrões, funcionando como agentes oxidantes, que sofrem redução (Baker e Aitken, 2004). Na presença de ROS, o potencial *redox* intracelular torna-se mais oxidativo (Morado *et al.*, 2013), ou seja, fica mais positivo, o que reflete a presença de um excesso de agentes pro-oxidantes e uma diminuição das defesas antioxidantes no gâmeta masculino (Sikka *et al.*, 1995). O  $H_2O_2$  poderá ser a principal ROS responsável por promover um ambiente mais oxidativo (Baker e Aitken, 2004).

Os efeitos negativos das RNS resultam em modificações pós-traducionais de proteínas, tais como a nitração de tirosinas (Herrero e Gagnon, 2001; Morielli e O'Flaherty, 2015). Esta modificação ocorre quando o  $ONOO^-$  - proveniente da reação de  $^{\bullet}O_2^-$  como  $NO^{\bullet}$  - reage com resíduos de tirosinas (Herrero, de Lamirande, *et al.*, 2001). Uma vez que o espermatozoide produz tanto  $^{\bullet}O_2^-$  como  $NO^{\bullet}$ , é expectável que estes dois reajam e se forme  $ONOO^-$  (Herrero e Gagnon, 2001). A nitração de tirosinas pode resultar na alteração da função ou da estrutura da proteína em causa (Morielli e O'Flaherty, 2015). No estudo levado a cabo por Morielli e O'Flaherty (2015) constatou-se que elevados níveis de nitração de tirosinas em proteínas do flagelo prejudicam gravemente a motilidade dos espermatozoides.

#### 1.7.1.4 Detecção de ROS/RNS

O *stress* oxidativo, enquanto causa da infertilidade masculina idiopática, tem sido um importante alvo de estudo nos últimos anos (Makker *et al.*, 2009). Uma vez que este tem um impacto tão elevado no contexto da infertilidade masculina e no sucesso das técnicas de PMA, é de extrema importância estudar e otimizar as diferentes metodologias de deteção das ROS/RNS no Sistema Reprodutor Masculino.

De forma a detetar as ROS/RNS existentes no espermatozoide humano, recorre-se ao uso de sondas fluorescentes, procurando-se usar diferentes sondas para as diferentes ROS e RNS, devendo os resultados ser obtidos através de microscopia de epifluorescência, a fim de se perceber em que local do espermatozoide é que as sondas apresentam marcação, e de citometria de fluxo. Para validar os mesmos, o uso das sondas fluorescentes deve ser acompanhado pela administração de compostos que levem a um aumento dos níveis da ROS/RNS em causa - controlo positivo.

Segundo a literatura, a sonda MitoSOX™ Red (Molecular Probes; Eugene, Oregon, EUA) deteta o  $^{\bullet}O_2^-$  de origem mitocondrial, a sonda DHE (Molecular Probes), igualmente conhecida por dihidroetídio, deteta o  $^{\bullet}O_2^-$  citosólico, a sonda

RedoxSensor™ Red CC-1 (Molecular Probes) é indicadora da atividade oxidativa das células, a sonda CellROX® Orange Reagent (Molecular Probes) deteta ROS, a sonda MitoPY1 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido) deteta o  $H_2O_2$  na mitocôndria e, por último, a sonda DAF-2 DA (Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EUA), também denominada por 4,5-diamino fluoresceína diacetato, deteta o  $NO^\bullet$ .

## 1.8 Objetivos

Existem diversas sondas fluorescentes que permitem a deteção de ROS/RNS nas células, no entanto, muitas ainda não foram testadas no espermatozoide humano. Uma vez que o espermatozoide é diferente das outras células do corpo humano, é necessário verificar se as sondas fluorescentes (MitoSOX™ Red, DHE, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1 e DAF-2 DA) se comportam da mesma maneira e, ao mesmo tempo, tentar aprofundar o papel que as ROS/RNS têm na infertilidade masculina idiopática.

Posto isto, o presente trabalho tem dois objetivos principais: a caracterização das várias sondas fluorescentes e a comparação de resultados da utilização das mesmas sondas com dados relativos aos espermatozoides e de resultados das técnicas de PMA.

Relativamente à caracterização das sondas fluorescentes, pretende-se, através de microscopia de epifluorescência e de citometria de fluxo, determinar qual a concentração de sonda a usar, onde é que no espermatozoide aparece a marcação da mesma, a que ROS/RNS é que cada sonda é sensível, qual o meio de cultura mais apropriado - tampão fosfato salino (PBS) suplementado ou *sperm preparation medium* (SPM), meio comercial - e verificar se existe alguma correlação entre as várias sondas fluorescentes.

Para se verificar a que ROS/RNS é que cada sonda é sensível, pretende-se utilizar, juntamente com as sondas, compostos que funcionem como controlos positivos. Mais concretamente, para as sondas MitoSOX™ Red, DHE, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent e MitoPY1, utilizam-se como controlos positivos a Antimicina A, o  $H_2O_2$  e o  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para a sonda DAF-2 DA usa-se como controlo positivo um composto que liberta  $NO^\bullet$  - a Espermina (*Spermine NONOate*).

Na segunda parte do trabalho, o objetivo é comparar os resultados da utilização das sondas, obtidos através da citometria de fluxo, com dados relativos aos espermatozoides - dados de qualidade espermática (volume do ejaculado, pH do ejaculado, concentração espermática, motilidade espermática, morfologia espermática,

concentração de leucócitos) e resultados de técnicas de PMA, tais como taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário e obtenção de gravidez.

## **Capítulo 2 - Materiais e Métodos**



## 2.1 Reagentes e Soluções

Neste trabalho os reagentes utilizados foram obtidos através da empresa Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, EUA) e a maioria das sondas fluorescentes foram fornecidas pela Molecular Probes (Eugene, Oregon, EUA). As exceções estão referenciadas ao longo deste capítulo.

Neste estudo foram usados dois meios de cultura: o meio de preparação de espermatozoides *sperm preparation medium* (SPM; Medicult-Origio; Jyllinge, Dinamarca) e o tampão fosfato salino (PBS) suplementado. O SPM é um meio comercial, utilizado na preparação das amostras de espermatozoides para as técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), tendo na sua constituição vermelho de fenol como indicador de pH. O PBS (GIBCO-Invitrogen; Carlsbad, Califórnia, EUA), fornecido na forma de pastilhas de 5g [compostas por: 0,01 M de fosfatos de sódio; 0,14 M de cloreto de sódio (NaCl); 0,003 M de cloreto de potássio (KCl)], foi dissolvido em 500 mL de água destilada. Posteriormente, este meio foi suplementado com 0,9 mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>); 0,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 5 mM de glucose; 1 mM de piruvato; 10 de mM lactato; 0,3% (v/v) de albumina do soro bovino e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (GIBCO-Invitrogen), testado previamente por A. Amaral *et al.*, 2011. O pH foi sempre acertado de forma a manter-se entre 7,2 e 7,4.

## 2.2 Material Biológico

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de pacientes que se deslocaram ao Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) com o intuito de realizar um exame complementar de diagnóstico, o espermograma, ou com indicação para a realização de técnicas de PMA - fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) - tendo estes assinado consentimentos informados para a disponibilização da amostra.

As amostras foram tratadas e analisadas de igual forma, quer se tratasse da realização de um espermograma ou da preparação de amostras para técnicas de PMA. Assim sendo, as amostras de ejaculado foram obtidas por masturbação após 3 a 5 dias de abstinência sexual. Após a colheita, estas permaneceram 10 minutos numa estufa a 37°C ou 20 minutos à temperatura ambiente, de forma a atingir a liquefação. Seguidamente, as amostras foram analisadas de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS; WHO, 2010). Tal como já foi referido (Capítulo 1, secção 1.1), estes parâmetros clínicos incluem análises de volume do ejaculado, pH do ejaculado, viscosidade do ejaculado, concentração espermática, motilidade

espermática, morfologia espermática, e presença ou ausência de leucócitos. As amostras podem assim ser classificadas em: normozoospermicas, oligozoospermicas, astenozoospermicas, teratozoospermicas, oligoastenoteratozoospermicas e leucocitoespermicas. As amostras normozoospermicas são as que respeitam a Tabela 1 (Capítulo 1, secção 1.1).

### 2.2.1 Preparação do Material Biológico

De forma a utilizar-se o material biológico não só em todas as experiências referidas neste trabalho, mas também na realização de espermogramas e de técnicas de PMA, procedeu-se à preparação do mesmo. O material biológico foi, inicialmente, preparado por centrifugação de gradiente de densidade. Para tal foram feitas duas soluções: uma com Supra Sperm™ (Medicult-Origio) a 80% e outra com Supra Sperm™ a 40%, ambas em SPM. Preparou-se um gradiente com 1 mL da solução a 80% e com 1 mL da solução a 40%, e de seguida colocou-se amostra de ejaculado por cima deste. A centrifugação por gradiente de densidade foi realizada a 1600 rpm durante 15 minutos. No final desta, o sobrenadante foi descartado, tendo-se ressuspensionado a fração correspondente aos espermatozoides em cerca de 3 mL de SPM.

De seguida, realizou-se mais uma centrifugação a 1300 rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante até restarem cerca de 0,5 mL de SPM no tubo.

Após as amostras terem sido utilizadas para as técnicas de PMA e na realização de espermogramas, estas foram ressuspensas em SPM, tendo-se dividido cada amostra em dois: parte permaneceu em SPM e a outra parte foi submetida a uma centrifugação adicional, a 1300 rpm durante 10 minutos, tendo-se removido no final desta o sobrenadante e ressuspensionado o *pellet* em PBS suplementado.

### 2.2.2 Parâmetros de Qualidade Espermática

#### 2.2.2.1 Concentração de Espermatozoides e de Leucócitos

A concentração de espermatozoides e de leucócitos foi avaliada no ejaculado antes de se ter procedido à preparação do material biológico.

De forma a calcular a concentração de espermatozoides e de leucócitos presente em cada amostra colocaram-se 10µL da mesma numa câmara de Makler. Com o auxílio do microscópio ótico *Nikon Labophot* (Nikon; Minato, Tóquio, Japão) realizou-se a contagem dos espermatozoides e de leucócitos na área delineada pela câmara e, posteriormente, efetuaram-se os cálculos necessários de forma a que fosse possível

expressar a concentração em número de espermatozoides ou de leucócitos (em milhões) por mL de amostra.

As amostras foram classificadas em termos de concentração de espermatozoides e de leucócitos de acordo com a terminologia da OMS (2010) descrita no Capítulo 1, secção 1.1.

#### 2.2.2.2 Motilidade Espermática

A motilidade dos espermatozoides foi avaliada no ejaculado antes de se ter procedido à preparação do material biológico.

A motilidade dos espermatozoides foi avaliada de acordo com os parâmetros da OMS (2010) podendo ser classificada de A a D. Atribui-se a classificação A aos espermatozoides que apresentaram uma motilidade progressiva rápida; B com uma motilidade progressiva lenta; C com um movimento *in situ* e D aos que estavam imóveis.

Para a determinação da motilidade de cada amostra colocaram-se 10 µL da mesma numa câmara de Makler. Com o auxílio do microscópio ótico *Nikon Labophot* (Nikon; 20x) realizou-se a contagem dos espermatozoides, na área delineada pela câmara, que apresentavam motilidade: A, B, C e D. A partir desta contagem foram determinadas as percentagens de espermatozoides com motilidade A+B, motilidade C e motilidade D.

#### 2.2.2.3 Morfologia Espermática

A morfologia dos espermatozoides foi avaliada no ejaculado antes de se ter procedido à preparação do material biológico.

Para tal recorreu-se ao uso do *kit* de coloração *Hemacolor® Rapid staining of blood smear* (Merck; Damstadt, Alemanha), que é composto por um fixador (metanol), um corante aniónico (eosina) e uma tiazina (azul de metileno). O corante aniónico tem como função marcar as proteínas de carga positiva/básicas de vermelho, enquanto que a tiazina marca o ADN de azul. Para cada amostra, colocaram-se 10 µL da suspensão celular numa lâmina, realizou-se um esfregaço e deixou-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, a lâmina foi mergulhada durante 10 segundos em cada uma das três soluções, consecutivamente - metanol, eosina e azul de metileno. Como intuito de remover o excesso de coloração, a lâmina foi passada por água corrente. Depois da secagem desta, montou-se a lamela e contaram-se os espermatozoides no microscópio *Olympus CH2* (Olympus; Shinjuku, Tóquio, Japão) sendo que em cada lâmina foram contados 200 espermatozoides. As principais regiões do espermatozoide - cabeça, peça intermédia e cauda - foram observadas, tendo sido registada a percentagem de

espermatozoides com morfologia normal e com defeito na cabeça, na peça intermédia e na cauda (WHO, 2010) e as amostras foram classificadas tal como é descrito no Capítulo 1, secção 1.1.

## 2.3 Sondas Fluorescentes

No presente trabalho, utilizaram-se várias sondas para a deteção das espécies reativas de oxigénio (ROS) existentes no espermatozoide, uma sonda para a deteção de uma espécie reativa de nitrogénio (RNS) - o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) - e uma para avaliar o estado *redox*.

A informação mencionada nesta secção refere-se ao que vem descrito na literatura, contudo um dos principais objetivos deste trabalho consistiu em verificar se tal informação é fiável.

### 2.3.1 MitoSOX™ Red

A sonda fluorescente utilizada para o estudo do anião superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) de origem mitocondrial foi o MitoSOX™ Red (excitação/emissão: 510/580 nm). Esta sonda é composta por dihidroetídio ligado ao catião trifenilfosfónio (TPP; Figura 7), sendo este último responsável por direccionar a sonda para a mitocôndria, após a entrada da mesma na célula (Aitken *et al.*, 2013). Uma vez na mitocôndria, o dihidroetídio reage com o  $\bullet\text{O}_2^-$ , formando-se um composto designado por 2-hidroxietídio (Figura 7), que emite fluorescência vermelha após a sua ligação ao ácido desoxirribonucleico (ADN; Mukhopadhyay *et al.*, 2007). A fluorescência detetada será proporcional à quantidade de 2-hidroxietídio formado e, por consequente, à quantidade de superóxido existente na mitocôndria (Mukhopadhyay *et al.*, 2007).

Esta sonda é amplamente utilizada em estudos onde se pretende detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial no espermatozoide humano (Aitken *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2013a; Marques *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2013).

### 2.3.2 DHE

Com o intuito de detetar a presença de  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico - proveniente da isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5) - utilizou-se a sonda DHE, igualmente denominada por dihidroetídio (excitação/emissão: 518/605 nm). Esta sonda tem uma composição semelhante ao MitoSOX™ Red, no entanto não tem o catião TPP (Figura 7; Koppers *et al.*, 2008). A DHE penetra a membrana citoplasmática e ao entrar em contacto com o  $\bullet\text{O}_2^-$  é oxidada

por este, formando-se o 2-hidroxi-etídio (Figura 7), que emite fluorescência vermelha após a ligação ao ADN nuclear (Koppers *et al.*, 2008).

A sonda DHE é utilizada em estudos onde se pretende detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico no espermatozoide humano (Aitken *et al.*, 2013; Koppers *et al.*, 2008; Musset *et al.*, 2012).

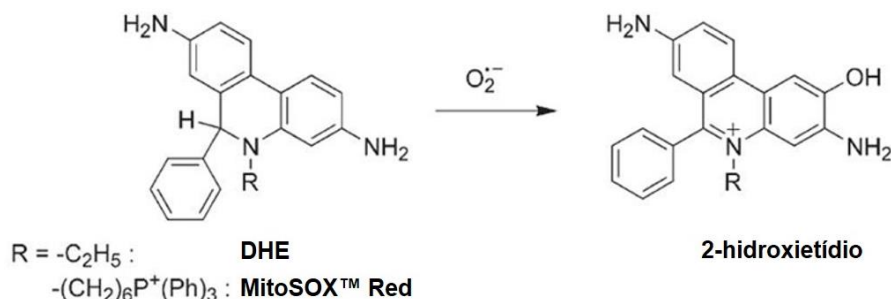


Fig. 7 - MitoSOX<sup>TM</sup> Red e DHE detetam o anião superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Esquema ilustrativo da reação das sondas MitoSOX<sup>TM</sup> Red e DHE (a diferença entre estas duas sondas está no grupo funcional, designado por R, que no caso da primeira sonda contém o catião trifenilfosfónio) com o  $\bullet\text{O}_2^-$ , formando-se o composto 2-hidroxi-etídio. Adaptado de: [http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS\\_services.html](http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS_services.html), acedido a 15/03/2016.

### 2.3.3 RedoxSensor<sup>TM</sup> Red CC-1

A sonda RedoxSensor<sup>TM</sup> Red CC-1 (excitação/emissão: 540/600 nm) é comumente utilizada como indicador da atividade oxidativa em células vivas (Morado *et al.*, 2013). Esta sonda entra passivamente na célula e é oxidada, no citosol, a um composto que emite fluorescência vermelha (Lopes *et al.*, 2010). Por sua vez, este irá acumular-se em diferentes locais da célula consoante o potencial *redox* do citosol (Lopes *et al.*, 2010). Uma vez que o *stress* oxidativo mediado pelas ROS conduz a um desequilíbrio do potencial *redox* intracelular, tornando-o mais oxidativo (Morado *et al.*, 2013; Capítulo 1, secção 1.7.1.3.2), houve interesse em testar esta sonda no presente trabalho.

Esta sonda, pelo que se constou das pesquisas efetuadas, ainda não foi, até à data, usada em espermatozoides humanos, tendo sido utilizada em espermatozoides de ratinho, num estudo levado a cabo por Palmer e colaboradores (2012), para determinação do potencial *redox* citosólico. A sonda RedoxSensor<sup>TM</sup> Red CC-1 tem sido também utilizada para medir a atividade oxidativa de oócitos de suíno (Tellado *et al.*, 2014), e de oócitos (Morado *et al.*, 2013) e embriões de bovino (Lopes *et al.*, 2010).

### 2.3.4 CellROX<sup>®</sup> Orange Reagent

A sonda CellROX<sup>®</sup> Orange Reagent (excitação/emissão: 545/565 nm) foi utilizada para a deteção de ROS (Fucikova *et al.*, 2014). Esta sonda não apresenta fluorescência enquanto se encontrar reduzida, passando a exibir fluorescência de tonalidade vermelha alaranjada após sofrer oxidação por ROS no citosol (Kang *et al.*,

2013). No presente trabalho recorreu-se ao uso da sonda CellROX® Orange Reagent com o objetivo de verificar se esta sonda deteta alguma ROS em particular.

Esta sonda, pelo que se constou das pesquisas efetuadas, ainda não foi, até à data, usada em espermatozoides, nem em espermatozoides humanos.

### 2.3.5 MitoPY1

Com o objetivo de detetar o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) na mitocôndria utilizou-se a sonda MitoPY1 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido). Esta sonda (excitação/emissão: 488/528 nm) é derivada do boronato (Gray *et al.*, 2013) - composto que ultimamente se tem utilizado na constituição de sondas altamente sensíveis a  $H_2O_2$  (Purdey *et al.*, 2015) - e tem na sua estrutura o catião TPP, que permite que a sonda se localize na mitocôndria (Dickinson *et al.*, 2013). Quando a sonda reage com o  $H_2O_2$ , ocorre a conversão do boronato em fenol e origina-se um composto - designado por MitoPY1ox - que emite fluorescência verde (Figura 8; Dickinson *et al.*, 2013).

Esta sonda, pelo que se constou das pesquisas efetuadas, ainda não foi, até à data, utilizada em espermatozoides humanos, tendo sido já usada em espermatozoides de ratinho, num estudo levado a cabo por Gray e colaboradores (2013) no qual se utilizou MitoPY1 para medição dos níveis de  $H_2O_2$  na mitocôndria. A literatura referente a esta sonda ainda é muito escassa e a própria bula de informação alerta para o facto desta ainda não estar certificada para ensaios clínicos.

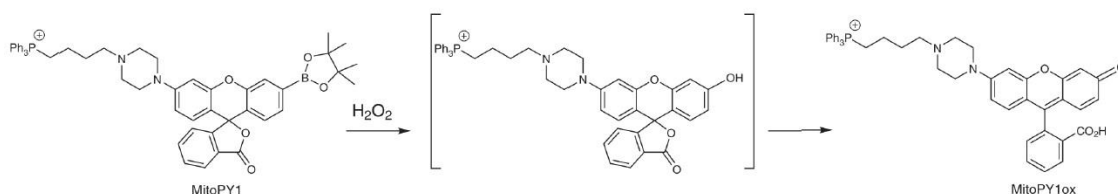


Fig. 8 - MitoPY1 deteta peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Esquema ilustrativo da reação da sonda fluorescente MitoPY1 com o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), formando-se o composto fluorescente - MitoPY1ox. Adaptado de Dickinson *et al.*, 2013.

### 2.3.6 DAF-2 DA

A sonda DAF-2 DA (Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EUA) foi utilizada para a deteção do  $NO^*$ . Segundo a bula de informação, esta sonda, também denominada por 4,5-diamino fluoresceína diacetato (excitação/emissão: 488/530 nm), ao entrar dentro da célula é hidrolisada a 4,5-diamino fluoresceína (DAF-2) pela ação de esterases intracelulares (Figura 9), prevenindo-se assim a saída da sonda da célula. Ao reagir com  $NO^*$ , a DAF-2 é convertida em triazol fluoresceína (DAF-2T; Figura 9), passando a emitir fluorescência de tonalidade verde (Roessner *et al.*, 2010).

A DAF-2 DA é utilizada em estudos nos quais se pretende avaliar o efeito do  $NO^*$  no espermatozoide humano (Herrero *et al.*, 2001; Roessner *et al.*, 2010). Esta sonda

também já foi usada para estudos onde se tentou perceber qual o efeito que certas substâncias, tais como insulina, leptina (Lampiao e Du Plessis, 2008) e melatonina (du Plessis *et al.*, 2010a), têm nos níveis de NO• no espermatozoide humano.

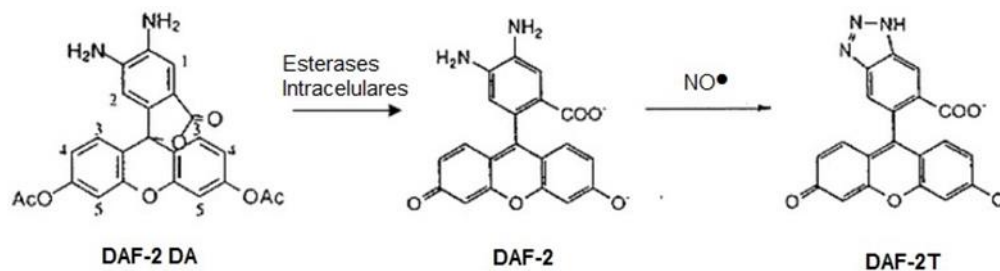


Fig. 9 – A 4,5-diamino fluoresceína diacetato (DAF-2 DA) permite a deteção de óxido nítrico (NO•). Esta sonda ao entrar dentro da célula é hidrolisada a 4,5-diamino fluoresceína (DAF-2) pela ação de esterases intracelulares. Ao reagir com NO•, a DAF-2 é convertida em triazol fluoresceína (DAF-2T), que é um composto altamente fluorescente. Adaptado de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d225?lang=pt&region=PT>, acedido a 23/03/2016.

## 2.4 Microscopia de Epifluorescência

### 2.4.1 Preparação das Suspensões Celulares

Às suspensões celulares com concentração de 5 milhões de espermatozoides por mL, adicionaram-se, separadamente, as sondas fluorescentes em SPM ou em PBS suplementado, utilizando-se diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação - numa estufa a 37°C, de forma a assegurar não só a entrada das sondas fluorescentes no espermatozoide, como também a sua reação com as ROS/RNS - consoante a sonda.

Para MitoSOX™ Red, testaram-se as seguintes concentrações: 3, 2, 1 e 0,5 µM (15 minutos de incubação); no caso de DHE: 1 µM, 800, 500, 300, 100 e 50 nM (15 minutos de incubação); para RedoxSensor™ Red CC-1: 5, 4, 3, 2 e 1 µM (10 minutos de incubação); para CellROX® Orange Reagent: 4, 3, 2 e 1 µM (30 minutos de incubação); para MitoPY1: 10, 8 e 5 µM (40 minutos de incubação); por fim, para a DAF-2 DA testaram-se as concentrações: 10, 5 e 1 µM (40 minutos de incubação).

Após o período de incubação, realizou-se centrifugação a 1800 rpm, durante 5 minutos, em que se desprezou o sobrenadante e se ressuspendeu o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado. Esta lavagem teve como objetivo a remoção de excesso de sonda fluorescente. De seguida, adicionou-se o marcador de ADN: Hoechst 33342 (Molecular Probes) de forma a tornar visíveis os núcleos dos espermatozoides. Colocaram-se cerca de 10 µL de suspensão celular numa lâmina, montou-se a lamela e analisou-se a marcação por microscopia de epifluorescência, no microscópio Zeiss AxioImager M1 (Carl Zeiss; Oberkochen, Alemanha). A fluorescência das sondas que emitem fluorescência vermelha (MitoSOX™ Red, DHE, RedoxSensor™ Red CC-1 e CellROX® Orange) foi detetada com o filtro 546/12. Para as que emitem fluorescência

verde (MitoPY1 e DAF-2 DA) esta foi detetada com o filtro 486/20. A fluorescência azul do Hoechst foi detetada com o filtro 365/12.

Através de microscopia de epifluorescência e de citometria de fluxo (técnica abordada na secção 2.5), concluiu-se que a melhor concentração para MitoSOX™ Red era a de 1 µM, para DHE era a de 50 nM, para RedoxSensor™ Red CC-1 era a de 3 µM, para CellROX® Orange Reagent era a de 1 µM, para MitoPY1 era a de 10 µM e para DAF-2 DA era a de 1 µM. Estas foram as concentrações usadas no resto do trabalho.

Com auxílio do microscópio Zeiss AxioImager M1 e do *software* AxioVision 4.7.2 (Carl Zeiss), determinou-se o local no espermatozoide onde as sondas fluorescentes apresentam marcação e contaram-se 200 espermatozoides por lâmina para calcular a percentagem de espermatozoides com marcação para comparar com os dados de percentagem de células marcadas obtidos por citometria de fluxo (técnica abordada na secção 2.5), para cada sonda fluorescente.

## 2.5 Citometria de Fluxo

### 2.5.1 Preparação das Suspensões Celulares

Para a citometria de fluxo utilizaram-se suspensões celulares com uma concentração de 5 milhões de espermatozoides por mL num volume final de 500 µL de SPM ou PBS suplementado. O material biológico foi preparado e logo analisado no citómetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson; Nova Jersey, EUA). Os resultados obtidos foram analisados no *software* *Infinicyt V1.7* (Infinicyt, Cytognos; Salamanca, Espanha).

Em cada condição foram adquiridas 200 000 células, tendo-se contabilizado a percentagem de células com marcação, e também a intensidade média de fluorescência da população correspondente aos espermatozoides.

Para o estudo de espermatozoides em citometria de fluxo é aplicada a escala logarítmica aos eixos relativos a *forward scatter* (FSC; equivalente ao tamanho da célula) e *side scatter* (SSC; corresponde à complexidade da célula). Em todas as experiências realizadas, analisou-se sempre, em primeiro lugar, a amostra em causa sem qualquer marcação de forma a verificar a autofluorescência da amostra, designado como controlo negativo (Figura 10).



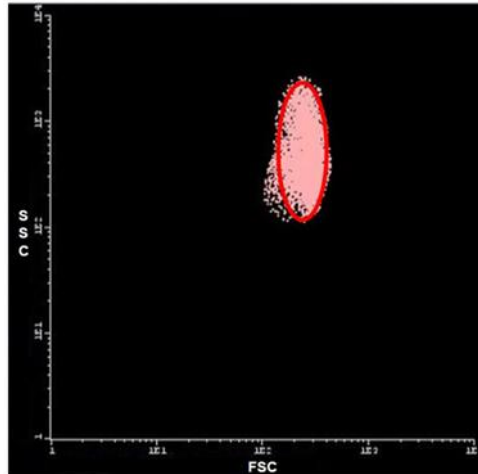


Fig. 10 - Controlo Negativo. *Dot plot* obtido após a análise de uma amostra de espermatozoides em PBS suplementado no citómetro de fluxo. Com o *side scatter* (SSC) e o *forward scatter* (FSC) foi possível identificar a população correspondente aos espermatozoides, destacada a vermelho.

#### 2.5.1.1 MitoSOX™ Red

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com MitoSOX™ Red a concentração final de 1  $\mu$ M num volume final de 500  $\mu$ L de SPM ou de PBS suplementado, durante 15 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência do MitoSOX™ Red foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro para o fluoróforo ficoeritrina (PE) com *bandpass* 575/26.

#### 2.5.1.2 DHE

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com DHE a concentração final de 50 nM num volume final de 500  $\mu$ L de SPM ou de PBS suplementado, durante 15 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado, de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência da DHE foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro PE com *bandpass* 575/26.

#### 2.5.1.3 RedoxSensor™ Red CC-1

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com RedoxSensor™ Red CC-1 a concentração final de 3  $\mu$ M num volume final de 500  $\mu$ L de SPM ou de PBS

suplementado, durante 10 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado, de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência do RedoxSensor™ Red CC-1 foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro PE com *bandpass* 575/26.

#### 2.5.1.4 CellROX® Orange Reagent

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com CellROX® Orange Reagent a concentração final de 1 µM num volume final de 500 µL de SPM ou de PBS suplementado, durante 30 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado, de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência do CellROX® Orange Reagent foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro PE com *bandpass* 575/26.

#### 2.5.1.5 MitoPY1

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com MitoPY1 a concentração final de 10 µM num volume final de 500 µL de SPM ou de PBS suplementado, durante 40 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado, de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência do MitoPY1 foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro isotiocianato de fluoresceína (FITC) com *bandpass* 530/30.

#### 2.5.1.6 DAF-2 DA

As suspensões celulares obtidas foram incubadas com DAF-2 DA a concentração final de 1 µM num volume final de 500 µL de SPM ou de PBS suplementado, durante 40 minutos, numa estufa a 37°C. Seguidamente, foi feita uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos. No final desta, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em SPM ou em PBS suplementado, de forma a retirar o excesso de marcador.

A fluorescência da DAF-2 DA foi determinada utilizando-se o *blue argon laser*, 488 nm, tendo sido a fluorescência detetada pelo filtro FITC com *bandpass* 530/30.

### 2.5.2 Controlos Positivos

De modo a caracterizar as sondas fluorescentes, recorreu-se ao uso de compostos que pudessem funcionar como controlos positivos a fim de se perceber a que ROS/RNS é que, de facto, cada sonda é sensível.

Para as sondas que são, ou poderão ser, sensíveis a ROS - MitoSOX™ Red, DHE, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent e MitoPY1 - utilizaram-se como controlos positivos a Antimicina A a 79 µM, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck Millipore) a 0,006 % (v/v), e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Bio-Rad; Hercules, Califórnia, EUA) a 100 µM.

A Antimicina A atua ao nível do Complexo III da cadeia transportadora de eletrões (CTE) e bloqueia a continuação do transporte de eletrões, levando a um aumento da produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial (Koppers *et al.*, 2008). O uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como controlo positivo permite não só a elevação dos níveis desta ROS, como também a ativação, indiretamente, da NOX5 e a consequente produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico (Musset *et al.*, 2012). Por fim, procurou-se testar se a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA conduz apenas à elevação dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sem que haja produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico, uma vez que o EDTA, ao sequestrar o cálcio (Ca<sup>2+</sup>), impede que a NOX5 seja ativada, não havendo produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico. Assim, comparando-se resultados obtidos com o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA como controlos positivos, pode-se averiguar se as sondas serão sensíveis ao  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico. Este controlo foi inspirado no trabalho de Musset e colaboradores (2012) no qual se utilizou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com o ácido 1,2-bis(2-aminofeniloxi)etano-N,N,N',N'-tetra-acético (BAPTA; outro sequestrador de Ca<sup>2+</sup>) para provar que a NOX5 produz  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico.

A Antimicina A e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram sempre adicionados às suspensões celulares em simultâneo com as sondas fluorescentes. No caso do terceiro controlo, primeiro adicionou-se às suspensões celulares o EDTA a 100 µM e incubou-se durante 5 minutos a 37°C. Seguidamente, adicionou-se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,006 % (v/v) em simultâneo com as sondas fluorescentes.

Para verificar se a sonda DAF-2 DA é sensível a NO• usou-se como controlo positivo um composto que liberta NO• - a Espermina (*Spermine NONOate*) - e conduz a um aumento da concentração desta RNS na célula (Champlin e Truman, 2000;

Dedkova *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2003). Usou-se então a Espermina a 50  $\mu$ M, tendo esta sido preparada em 0,01 M de hidróxido de sódio (NaOH), de forma a garantir a sua estabilidade durante 24 horas. A Espermina foi sempre adicionada às suspensões celulares em simultâneo com a DAF-2 DA.

## 2.6 Caraterização das Sondas Fluorescentes

A primeira parte do presente trabalho consistiu na caraterização das sondas fluorescentes - qual a concentração de sonda a usar, onde é que no espermatozoide aparece marcação, a que ROS/RNS é que cada sonda é sensível, qual o meio de cultura mais apropriado, se PBS suplementado ou SPM e verificar se há alguma correlação entre as sondas fluorescentes - tendo-se recorrido à microscopia de epifluorescência, somente nesta parte do trabalho, e ainda à citometria de fluxo.

## 2.7 Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de PMA

Na segunda parte do trabalho, procurou-se utilizar as sondas fluorescentes a fim de comparar os resultados da utilização das sondas com dados relativos aos espermatozoides - dados de qualidade espermática e resultados de técnicas de PMA. As sondas foram também comparadas entre si. Nesta parte recorreu-se apenas à citometria de fluxo.

Os dados de qualidade espermática avaliados foram o volume do ejaculado, pH do ejaculado, concentração espermática, motilidade espermática, morfologia espermática e concentração de leucócitos. As amostras foram ainda classificadas de acordo com os dados de qualidade espermática, tendo-se criado um grupo denominado por “não normozoospermia” que se refere a amostras com um ou dois parâmetros qualidade espermática - concentração, motilidade ou morfologia - alterados.

Os resultados de técnicas de PMA correspondem a taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário e a obtenção de gravidez. A taxa de fecundação refere-se ao quociente entre o número de oócitos fecundados sobre o número total de oócitos obtidos da punção folicular. Em relação à taxa de desenvolvimento embrionário, esta foi calculada de duas maneiras diferentes. Uma corresponde ao quociente entre o número de embriões existente ao terceiro ou quinto dia após a fecundação, sobre o número total de oócitos obtidos da punção folicular. Na outra forma, o numerador é o mesmo, mas o denominador refere-se ao número de oócitos fecundados. Quanto à gravidez, esta foi classificada enquanto bioquímica - através da realização do teste imunológico de gravidez, no qual se deteta a gonadotropina coriónica humana, produzida pelo embrião

após a nidação - e clínica - confirmada por um médico obstetra através da realização de uma ecografia às 6/7 semanas, havendo a presença de saco gestacional e de embrião (Zegers-Hochschild et al., 2009).

## 2.8 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o *software IBM® SPSS® Statistics* versão 22.0 (Armonk, Nova Iorque, EUA).

Em primeiro lugar, averiguou-se, com o teste Kolmogorov-Smirnov, se os dados tinham uma distribuição normal. Neste trabalho recorreu-se sempre a testes estatísticos não paramétricos, pois os parâmetros avaliados não respeitaram a distribuição normal. Assim, nos casos em que se pretendeu comparar três ou quatro variáveis de estudo, relacionadas entre si, utilizou-se o teste de Friedman e quando se pretendeu comparar duas variáveis de estudo, também relacionadas entre si, o nível de significância foi dado pelo teste de classificações assinadas por Wilcoxon. Quando se compararam duas variáveis de estudo independentes, realizou-se o teste de Mann-Whitney. No caso das correlações foi utilizado o teste de Spearman.

Sempre que se obteve um valor de  $p < 0,05$ , as diferenças entre as variáveis foram consideradas estatisticamente significativas. Os dados estão apresentados em forma de média  $\pm$  desvio padrão.

## **Capítulo 3 - Resultados**

### 3.1 Caraterização das Sondas Fluorescentes

#### 3.1.1 Tampão Fosfato Salino Suplementado vs *Sperm Preparation Medium*

Na primeira parte do trabalho pretendeu-se verificar qual é que seria o melhor meio para realizar as experiências, se o *sperm preparation medium* (SPM), se o tampão fosfato salino (PBS) suplementado.

O SPM é um meio comercial amplamente utilizado na área da medicina da reprodução para preparar e manter os espermatozoides. Porém, na sua composição o SPM tem vermelho de fenol, composto de cor vermelha que poderia interferir com a captação da fluorescência emitida pelos fluoróforos. Como tal pensou-se que seria prudente testar também as sondas em PBS suplementado, que é um meio incolor, muito utilizado em investigação e que permite a sobrevivência e a manutenção dos espermatozoides (A. Amaral *et al.*, 2011).

Por citometria de fluxo, analisou-se a mesma amostra de espermatozoides ressuspensa em SPM (Figura 11 A) ou em PBS suplementado (Figura 11 B). Como se pode observar (Figura 11 A), a população de espermatozoides encontra-se ligeiramente deslocada da origem dos eixos do *dot plot*, porém continua a permanecer, maioritariamente, na região onde há ausência de marcação. Na Figura 11 B constata-se que a população já se encontra bem posicionada na região do *dot plot* onde há ausência de marcação. Analisaram-se também no citómetro de fluxo amostras de espermatozoides incubadas com as sondas fluorescentes em SPM ou em PBS suplementado. De facto, com SPM notou-se uma ligeira deslocação, em relação à origem do *dot plot*, da população de espermatozoides que não tem marcação (dados não apresentados).

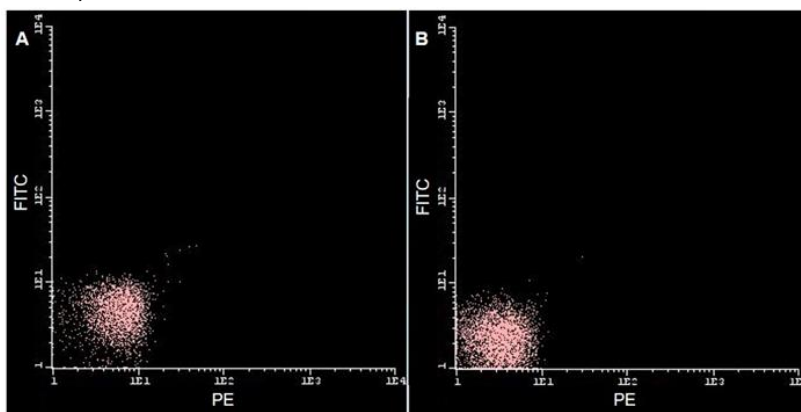


Fig. 11 - Tampão fosfato salino (PBS) suplementado vs *sperm preparation medium* (SPM). *Dot plot* obtido após a análise de uma amostra de espermatozoides em SPM (A) e em PBS suplementado (B) no citómetro de fluxo.

De forma a verificar se existiriam diferenças na marcação das sondas fluorescentes caso estas fossem adicionadas às suspensões celulares em PBS

suplementado ou em SPM, recorreu-se também à microscopia de epifluorescência. Não se encontraram diferenças no local onde o espermatozoide apresenta a marcação (dados não apresentados).

Por microscopia de epifluorescência, determinaram-se ainda as percentagens de espermatozoides com marcação, de forma a comparar com os dados relativos à percentagem de células marcadas obtidos por citometria de fluxo, para cada sonda fluorescente, nas suspensões celulares em SPM ou em PBS suplementado. Constatou-se que, para cada sonda, comparando a condição SPM com PBS suplementado por citometria de fluxo e por microscopia de epifluorescência, não houve diferença na percentagem de células marcadas (dados não apresentados).

### 3.1.2 MitoSOX™ Red

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda MitoSOX™ Red apresenta marcação, predominantemente, na cabeça do espermatozoide (Figura 12). Em casos raros, a marcação desta sonda surgiu na peça intermédia do espermatozoide, como se pode verificar na Figura 12. Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com os controlos positivos (Antimicina A, peróxido de hidrogénio -  $H_2O_2$  - e  $H_2O_2$  mais ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).



Fig. 12 - Avaliação da marcação da sonda MitoSOX™ Red no espermatozoide. Imagem representativa de sete espermatozoides cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda MitoSOX™ Red a  $1 \mu M$  apresenta marcação (vermelho) na cabeça de cinco dos espermatozoides e na peça intermédia de um dos espermatozoides. Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, averiguou-se se havia interferência do PBS suplementado com a sonda MitoSOX™ Red sem a presença de espermatozoides. Procurou-se também verificar se os controlos positivos juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides mas sem a sonda, levavam ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de controlos positivos juntamente com a sonda MitoSOX™ Red foi essencial para se perceber a que espécies reativas de



oxigênio (ROS) é que esta sonda é sensível. Na Figura 13 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 13 A), com marcação de MitoSOX™ Red (Figura 13 B), com marcação de MitoSOX™ Red e Antimicina A (Figura 13 C), com marcação de MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13 D), e, por fim, com marcação de MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (Figura 13 E).

No histograma da Figura 13 B é de notar que existe uma população na região onde não há marcação e outra na região correspondente à existência de marcação. Da Figura 13 B para a Figura 13 C ocorreu um notório aumento da população localizada na região onde há marcação. Da Figura 13 B para a Figura 13 D e da Figura 13 B para a Figura 13 E ocorreu um ligeiro aumento da população localizada na região onde há marcação, havendo na mesma uma população na região onde não há marcação. De notar que os histogramas da Figura 13 D e E são semelhantes.

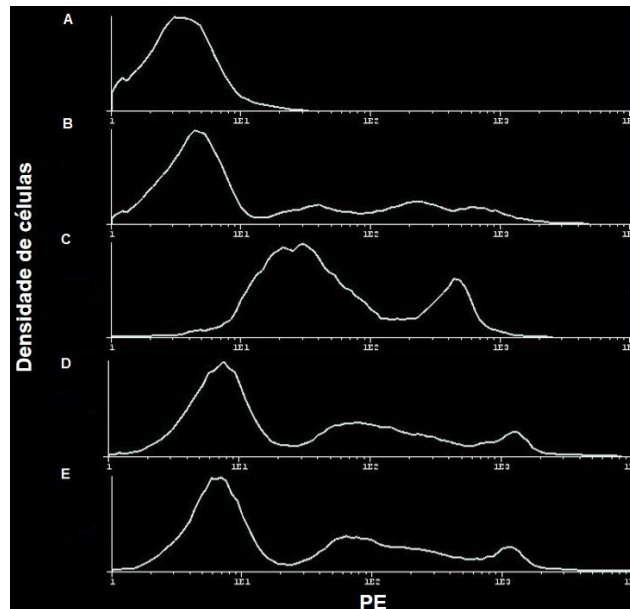


Fig. 13 - MitoSOX™ Red e os controlos positivos. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de MitoSOX™ Red a 1  $\mu$ M (B), com marcação de MitoSOX™ Red a 1  $\mu$ M e Antimicina A a 79  $\mu$ M (C), com marcação de MitoSOX™ Red a 1  $\mu$ M e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0,006 % (v/v; D), e com marcação de MitoSOX™ Red a 1  $\mu$ M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 100  $\mu$ M (E).

Através do gráfico da Figura 14 A é possível constatar que há diferença estatisticamente significativa ( $n=15$ ;  $***p<0,001$ ) entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red ( $43,07 \pm 20,08$ ), MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $82,22 \pm 13,32$ ), MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $90,14 \pm 11,49$ ), MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $79,33 \pm 15,40$ ). Nas condições em que se utilizam os controlos positivos há sempre um aumento da percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas MitoSOX™ Red.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=33$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 14 B) entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red ( $36,04 \pm 17,66$ ) e com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $86,94 \pm 12,17$ ). Entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red ( $35,73 \pm 18,61$ ) e com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $83,97 \pm 20,81$ ) também se verificou uma diferença estatisticamente significativa ( $n=31$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 14 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=15$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 14 D) entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red ( $43,07 \pm 20,08$ ) e com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $79,33 \pm 15,40$ ).

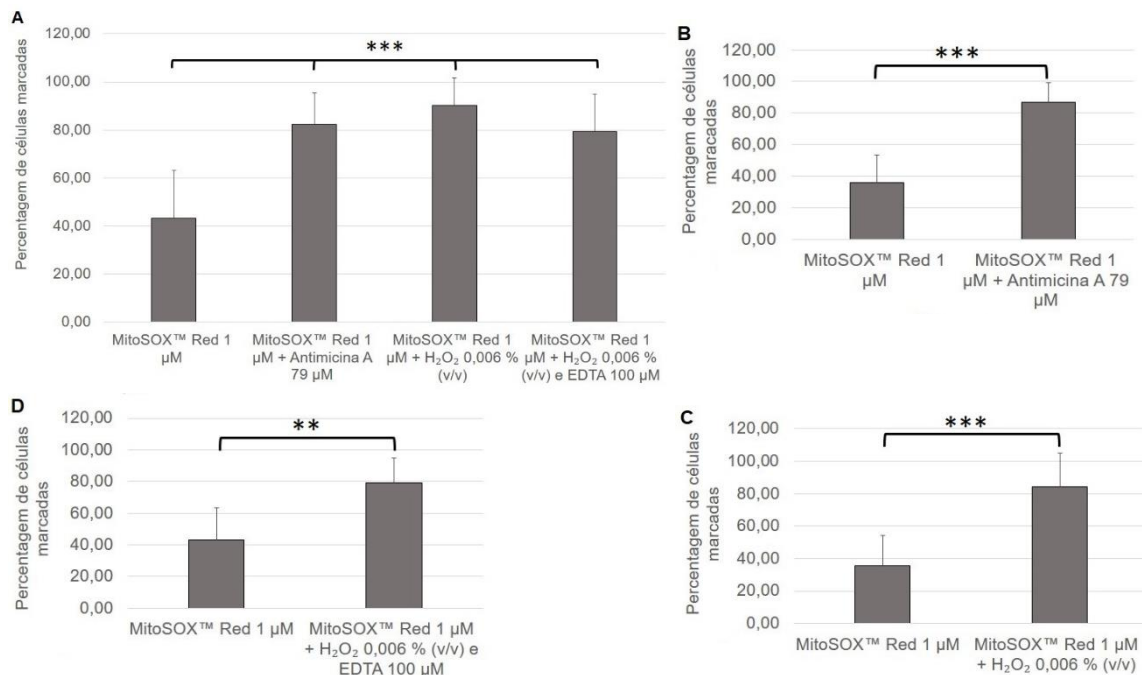


Fig. 14 - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e com MitoSOX™ Red e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red, MitoSOX™ Red e Antimicina A, MitoSOX™ Red e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=15$ , A). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ e Antimicina A ( $n=33$ , B). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $n=31$ , C). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=15$ , D). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os três controlos positivos entre si: MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $82,22 \pm 13,32$ ), MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $90,14 \pm 11,49$ ) e MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $79,33 \pm 15,40$ ) há diferença estatisticamente significativa ( $n=15$ ;  $*p<0,05$ ; Figura 15 A) na percentagem de células marcadas. Porém, quando se compara a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $87,37 \pm 11,44$ ) com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $86,15 \pm 17,19$ ) não há diferença estatisticamente significativa entre estes dois controlos ( $n=30$ , Figura 15 B). O mesmo se verificou ao comparar a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $82,22 \pm 13,32$ ) com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $79,33 \pm 15,40$ ;

n=15; Figura 15 C). Em relação à percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (90,14 ± 11,49) com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (79,33 ± 15,40), há diferença estatisticamente significativa (n=15; \*p<0,05; Figura 15 D).

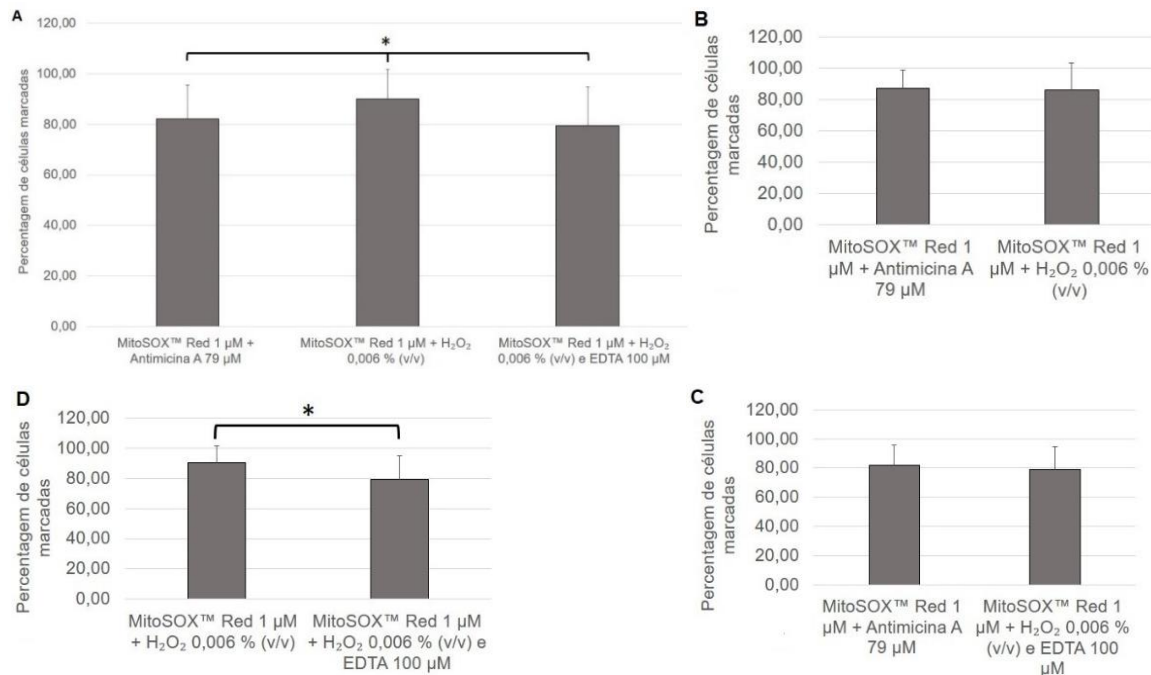


Fig. 15 - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A, MitoSOX<sup>TM</sup> Red e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=15, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=30, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=15, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=15, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*p<0,05. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

No gráfico da Figura 16 A procurou-se comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red (152,24 ± 83,63), MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A (224,60 ± 104,46), MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (291,91 ± 144,10), MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (266,83 ± 175,79). Entre estas quatro condições há diferença estatisticamente significativa (n=15; \*\*\*p<0,001; Figura 16 A). Nas condições onde se utilizam os controlos positivos, verifica-se sempre um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas MitoSOX<sup>TM</sup> Red.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=33$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 16 B) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red ( $119,15 \pm 77,60$ ) com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $213,44 \pm 97,51$ ). Em relação à intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red ( $119,79 \pm 80,22$ ) com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $243,03 \pm 159,85$ ) verifica-se que há diferença estatisticamente significativa ( $n=31$ ;  $*p<0,05$ ; Figura 16 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=15$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 16 D) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red ( $152,24 \pm 83,63$ ) com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $266,83 \pm 175,79$ ).

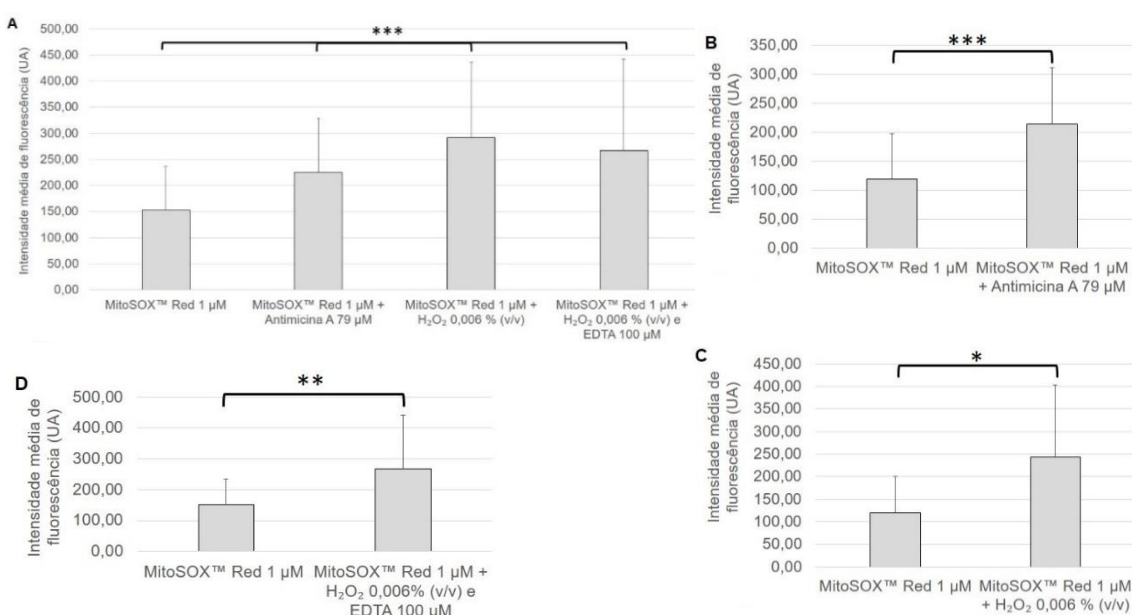


Fig. 16 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e com MitoSOX™ Red e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red, MitoSOX™ Red e Antimicina A, MitoSOX™ Red e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=15$ , A). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $n=33$ , B). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $n=31$ , C). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=15$ , D). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si ( $n=15$ , Figura 17 A), não há diferença estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $224,60 \pm 104,46$ ), MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $291,91 \pm 144,10$ ) MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $266,83 \pm 175,79$ ). Ao comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e Antimicina A ( $209,36 \pm 94,38$ ) com MitoSOX™ Red e  $H_2O_2$  ( $249,61 \pm 158,25$ ) também se verifica que não há

diferença estatisticamente significativa ( $n=30$ ; Figura 17 B). O mesmo acontece entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A ( $224,60 \pm 104,46$ ) com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $266,83 \pm 175,79$ ;  $n=15$ ; Figura 17 C) e para a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $291,91 \pm 144,10$ ) com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $266,83 \pm 175,79$ ;  $n=15$ ; Figura 17 D).

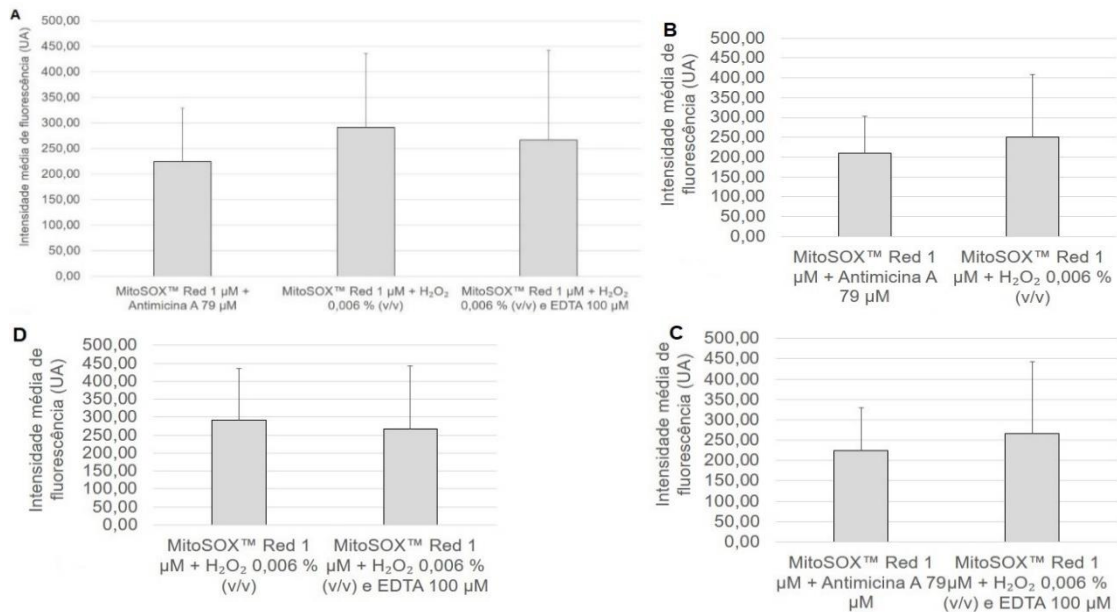


Fig. 17 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A, MitoSOX<sup>TM</sup> Red e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=15$ , **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n=30$ , **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e Antimicina A com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $n=15$ , **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoSOX<sup>TM</sup> Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $n=15$ , **D**). Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.3 DHE

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda DHE apresenta marcação na cabeça do espermatozoide (Figura 18). Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com os controlos positivos (Antimicina A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais EDTA). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).

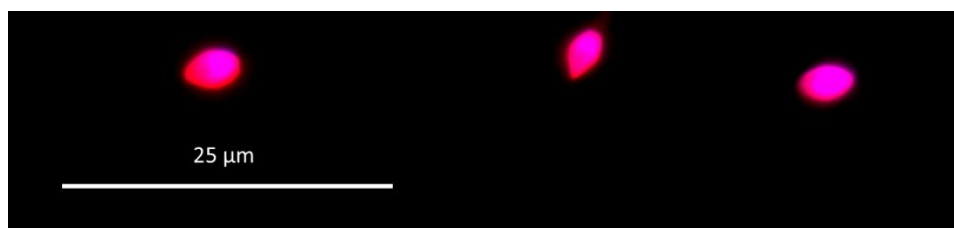


Fig. 18 - Avaliação da marcação da sonda DHE no espermatozoide. Imagem representativa de três espermatozoides, cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda DHE a 50 nM apresenta marcação (vermelho) na cabeça dos espermatozoides. Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, averiguou-se se havia interferência do PBS suplementado com a sonda DHE sem a presença de espermatozoides. Procurou-se também verificar se os controlos positivos juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides, mas sem a sonda, levavam ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de controlos positivos juntamente com a sonda DHE foi essencial para se perceber a que ROS é que esta sonda é sensível. Na Figura 19 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 19 A), com marcação de DHE (Figura 19 B), com marcação de DHE e Antimicina A (Figura 19 C), com marcação de DHE e  $H_2O_2$  (Figura 19 D), e, por fim, com marcação de DHE e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 19 E).

O histograma da Figura 19 B tem duas populações, uma está localizada tanto na região onde não há marcação, como na região onde há marcação, e a outra encontra-se nesta última região. Da Figura 19 B para a Figura 19 C, a primeira população passa a estar localizada na região onde há marcação, mas a segunda população não sofre alterações. Da Figura 19 B para a Figura 19 D a primeira população continua localizada tanto na região onde não há marcação, como na onde há marcação, apesar de se encontrar ligeiramente deslocada para a direita e a segunda população sofreu um ligeiro deslocamento para uma região de maior intensidade de fluorescência, permanecendo na mesma na região onde há marcação. Não existe diferença entre os histogramas da Figura 19 B e E. Ainda assim, os histogramas da Figura 19 D e E são semelhantes.



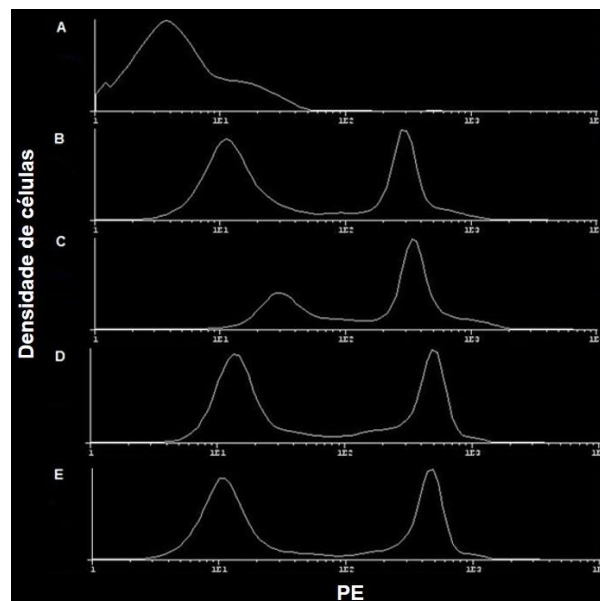


Fig. 19 - DHE e os controlos positivos. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de DHE a 50 nM (B), com marcação de DHE a 50 nM e Antimicina A a 79  $\mu$ M (C), com marcação de DHE a 50 nM e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 0,006 % (v/v; D), e com marcação de DHE a 50 nM e  $H_2O_2$  a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 100  $\mu$ M (E).

Comparando-se a percentagem de células marcadas com DHE ( $44,95 \pm 19,99$ ), DHE e Antimicina A ( $78,45 \pm 24,71$ ), DHE e  $H_2O_2$  ( $59,06 \pm 24,49$ ) e DHE e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $59,58 \pm 24,32$ ), verifica-se que há diferença estatisticamente significativa ( $n=19$ ;  $***p<0,001$ ) entre estas quatro condições (Figura 20 A). Nos casos em que se utilizam os controlos positivos há sempre um aumento na percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas DHE.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=37$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 20 B) entre a percentagem de células marcadas com DHE ( $37,73 \pm 19,15$ ) com DHE e Antimicina A ( $76,97 \pm 23,32$ ). Entre a percentagem de células marcadas com DHE ( $38,27 \pm 19,14$ ) com DHE e  $H_2O_2$  ( $57,25 \pm 27,83$ ) também se verifica que há diferença estatisticamente significativa ( $n=36$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 20 C). Por fim, há diferença estatisticamente significativa ( $n=19$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 20 D) entre a percentagem de células marcadas com DHE ( $44,95 \pm 19,99$ ) com DHE e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $59,58 \pm 24,32$ ).

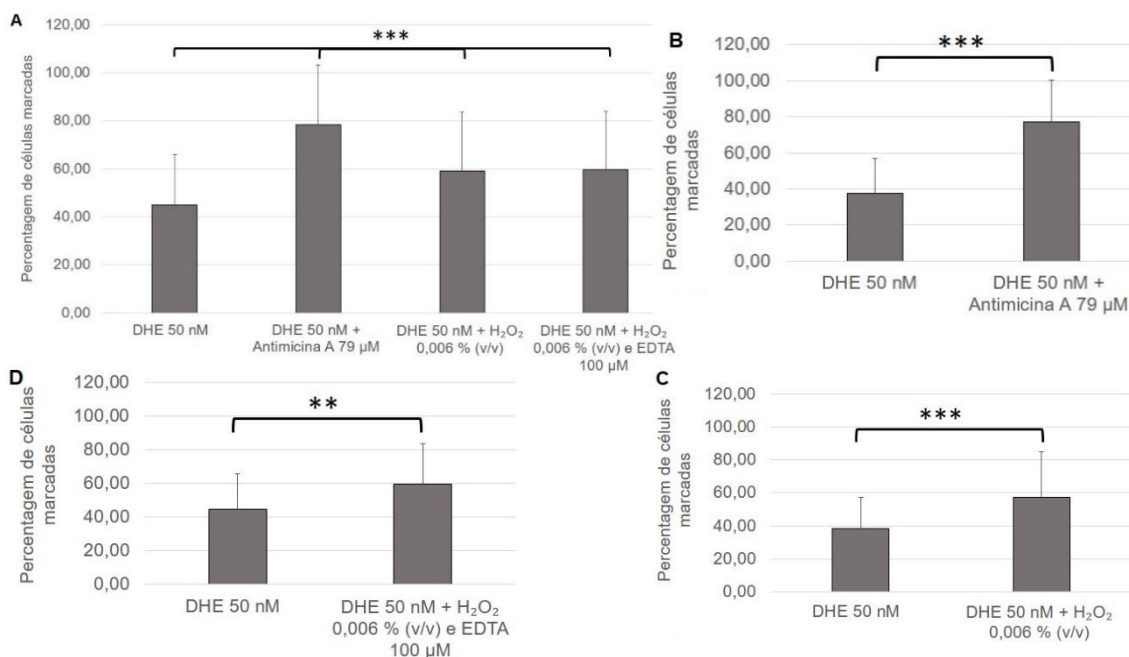


Fig. 20 - Avaliação da percentagem de células marcadas com DHE e com DHE e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE, DHE e Antimicina A, DHE e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=19, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE com DHE e Antimicina A (n=37, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=36, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si (n=19; Figura 21 A) não há diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A (78,45 ± 24,71), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (59,06 ± 24,49), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (59,58 ± 24,32). Porém, há diferença estatisticamente significativa (n=36; \*\*p<0,01; Figura 21 B) entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A (76,53 ± 23,50) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (57,25 ± 27,83). Entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A (78,45 ± 24,71) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (59,58 ± 24,32), também se verifica que há diferença estatisticamente significativa (n=19; \*p<0,05; Figura 21 C). Não há diferença estatisticamente significativa (n=19; Figura 21 D) entre a percentagem de células marcadas com DHE (59,06 ± 24,49) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (59,58 ± 24,32).



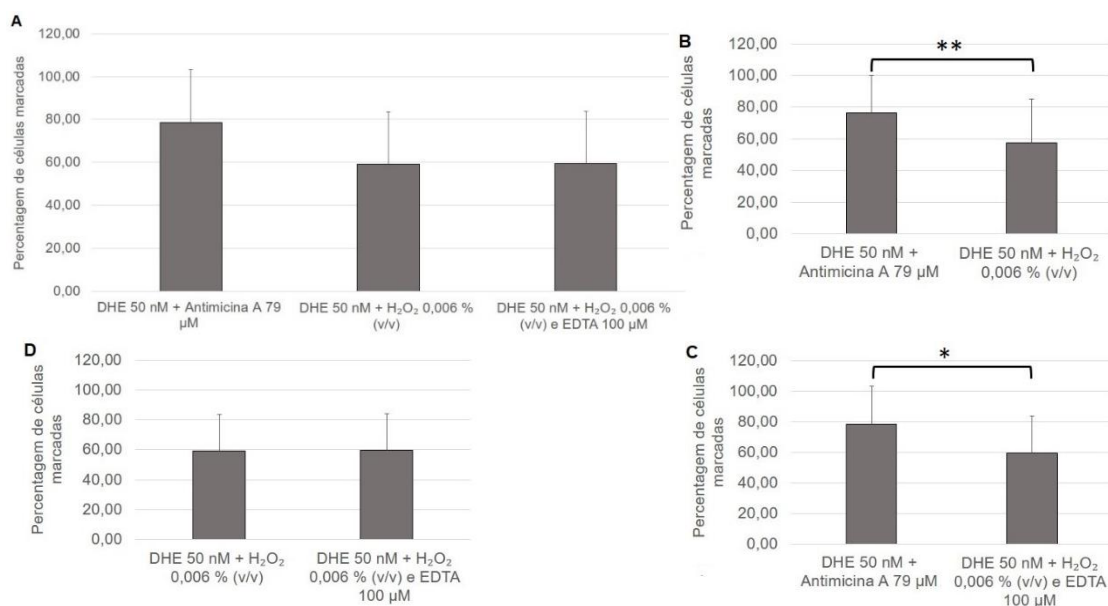


Fig. 21 - Avaliação da percentagem de células marcadas com DHE e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A, DHE e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=19, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=36, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE e Antimicina A com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*p<0,05 e \*\*p<0,01. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

O gráfico da Figura 22 A refere-se à comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE (284,92 ± 169,17), DHE e Antimicina A (569,44 ± 395,32), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (350,03 ± 168,58), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (415,47 ± 235,11). Entre estas quatro condições há diferença estatisticamente significativa (n=19; \*p<0,05; Figura 22 A). Nas condições onde se utilizam os controlos positivos, verifica-se sempre um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas DHE.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa (n=37; \*\*\*p<0,001; Figura 22 B) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE (212,78 ± 153,11) com DHE e Antimicina A (436,26 ± 346,16). Em relação à intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE (216,30 ± 153,75) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (325,53 ± 216,18) verifica-se que há diferença estatisticamente significativa (n=36; \*\*\*p<0,001; Figura 22 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa (n=19; \*p<0,05; Figura 22 D) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE (284,92 ± 169,17) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (415,47 ± 235,11).

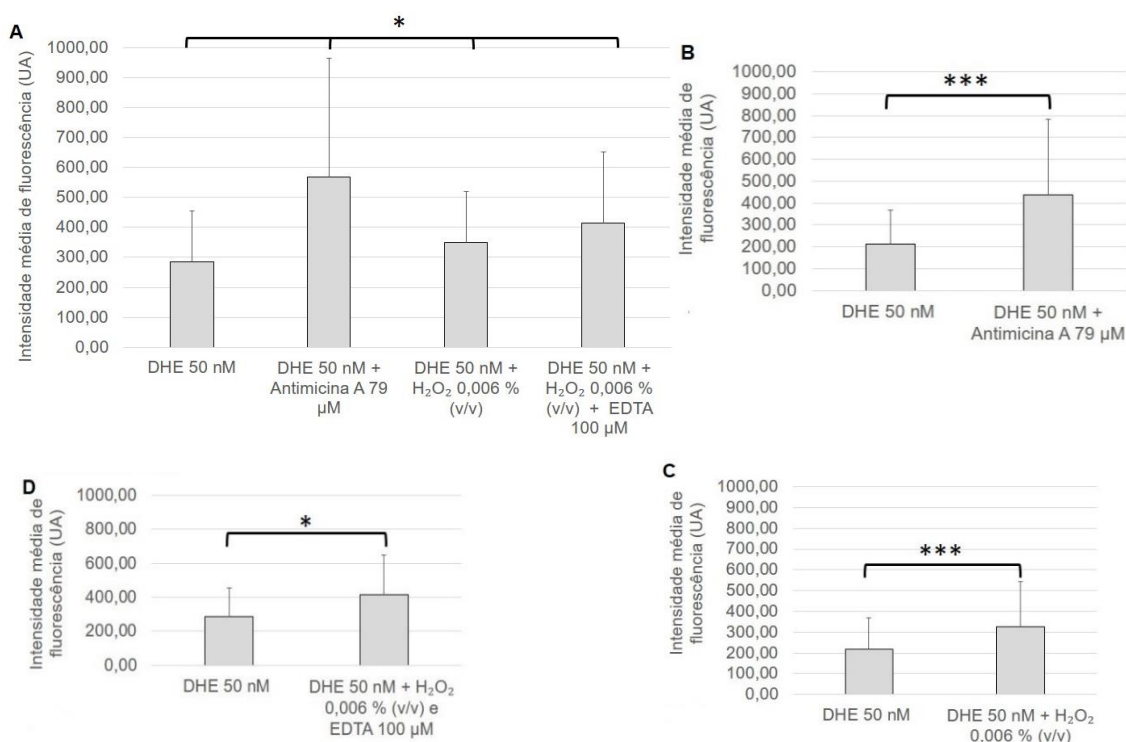


Fig. 22 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e com DHE e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE, DHE e Antimicina A, DHE e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=19, **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE com DHE e Antimicina A (n=37, **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=36, **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si (n=19; Figura 23 A), não há diferença estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A ( $569,44 \pm 395,32$ ), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $350,03 \pm 168,58$ ) DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $415,47 \pm 235,11$ ). Ao comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A ( $442,33 \pm 349,06$ ) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $325,53 \pm 216,18$ ) também se verifica que não há diferença estatisticamente significativa (n=36; Figura 23 B). O mesmo acontece entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A ( $569,44 \pm 395,32$ ) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $415,47 \pm 235,11$ ; n=19; Figura 23 C) e para a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $350,03 \pm 168,58$ ) com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $415,47 \pm 235,11$ ; n=19; Figura 23 D).

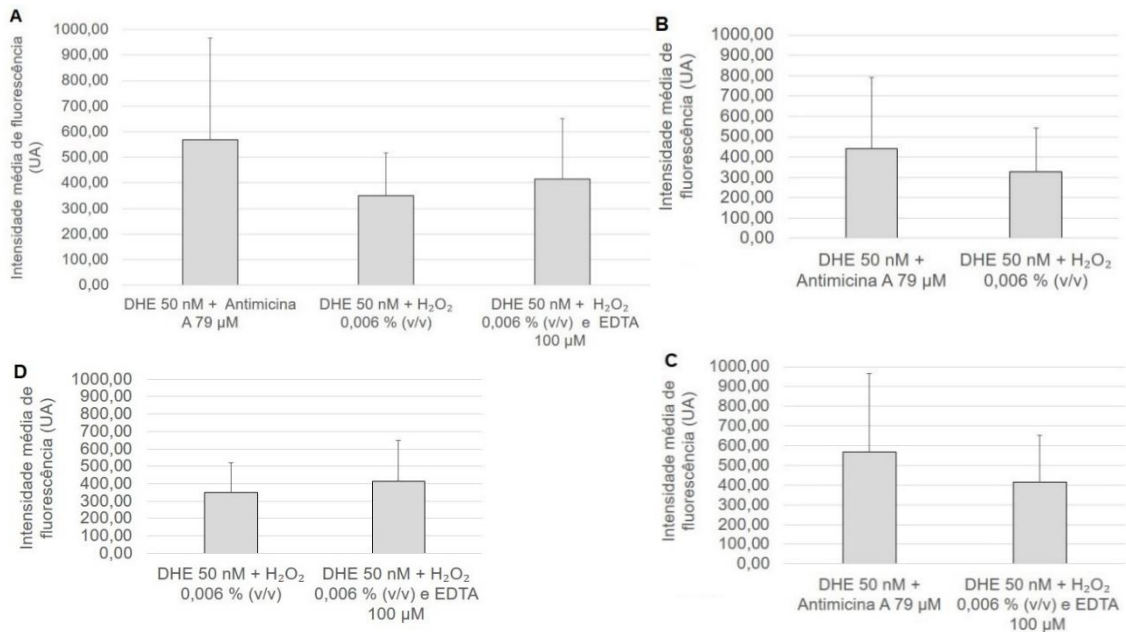


Fig. 23 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A, DHE e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=19, **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=36, **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e Antimicina A com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com DHE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=19, **D**). Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

### 3.1.4 RedoxSensor™ Red CC-1

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 apresenta marcação na cabeça e na peça intermédia do espermatozoide (Figura 24). Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com os controlos positivos (Antimicina A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais EDTA). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).

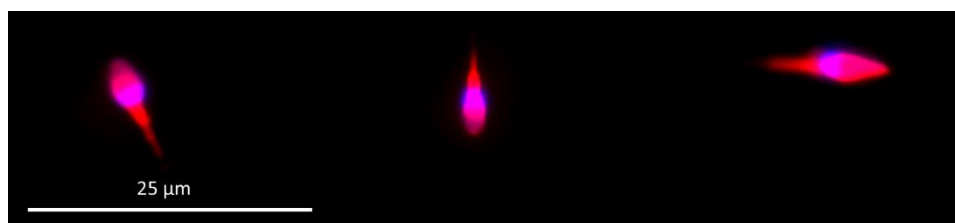


Fig. 24 - Avaliação da marcação da sonda RedoxSensor™ Red CC-1 no espermatozoide. Imagem representativa de três espermatozoides, cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 a 3 µM apresenta marcação na cabeça e na peça intermédia dos espermatozoides (vermelho). Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, procurou-se verificar se havia interferência do PBS suplementado com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 sem a presença de espermatozoides. Averiguou-se também se os controlos positivos juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides, mas sem a sonda, levavam ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de controlos positivos juntamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 foi essencial para se perceber se esta sonda poderia ser sensível a alguma ROS. Na Figura 25 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 25 A), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 (Figura 25 B), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A (Figura 25 C), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 25 D), e, por fim, com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (Figura 25 E).

No histograma da Figura 25 B há apenas uma população, estando esta localizada praticamente na região onde não há marcação. Da Figura 25 B para a Figura 25 C não há alteração, os histogramas são praticamente iguais. Da Figura 25 B para a Figura 25 D a população passou a localizar-se em ambas as regiões. Da Figura 25 B para a Figura 25 E a população sofreu um ligeiro deslocamento para a direita, passando a estar localizada tanto na região onde não há marcação, como na onde há.

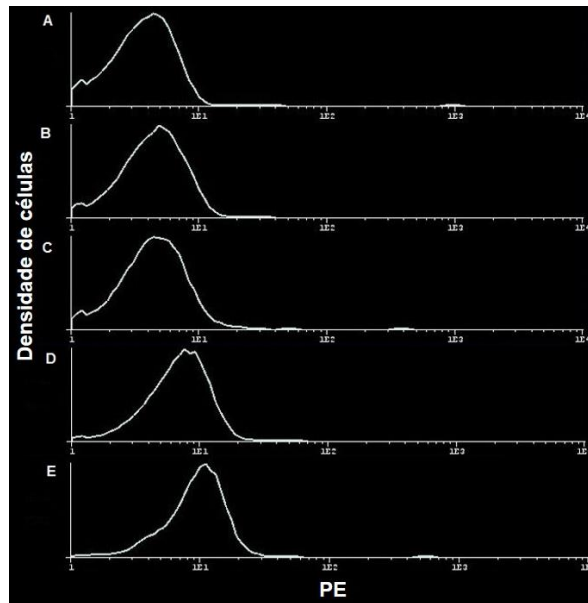


Fig. 25 - RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 a 3  $\mu$ M (B), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 a 3  $\mu$ M e Antimicina A a 79  $\mu$ M (C), com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 a 3  $\mu$ M e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 0,006 % (v/v; D), e com marcação de RedoxSensor™ Red CC-1 a 3  $\mu$ M e  $H_2O_2$  a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 100  $\mu$ M (E).

Através do gráfico da Figura 26 A é possível constatar que há diferença estatisticamente significativa ( $n=18$ ;  $***p<0,001$ ) entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 ( $8,07 \pm 5,36$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $10,66 \pm 7,62$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  ( $30,43 \pm 16,78$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $29,98 \pm 15,30$ ). Nas condições em que se utilizam os controlos positivos há sempre um aumento da percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas RedoxSensor™ Red CC-1.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=29$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 26 B) entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 ( $7,47 \pm 5,87$ ) e com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $9,78 \pm 7,45$ ). Entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 ( $8,22 \pm 7,41$ ) e com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  ( $28,85 \pm 16,80$ ) também se verificou uma diferença estatisticamente significativa ( $n=31$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 26 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=18$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 26 D) entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 ( $8,07 \pm 5,36$ ) e com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $29,98 \pm 15,30$ ).

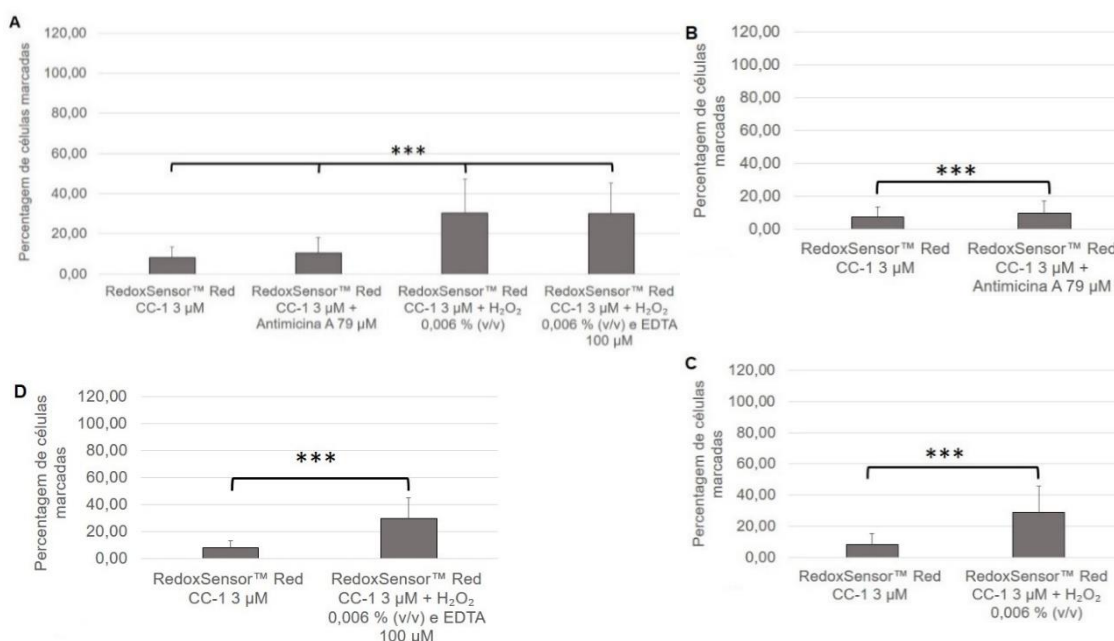


Fig. 26 - Avaliação da percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1, RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A, RedoxSensor™ Red CC-1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=18, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A (n=29, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=31, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=18, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

Comparando os três controlos positivos entre si: RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $10,66 \pm 7,62$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $30,43 \pm 16,78$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $29,98 \pm 15,30$ ) há diferença estatisticamente significativa (n=18; \*\*\*p<0,001; Figura 27 A) na percentagem de células marcadas. Ao comparar-se a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $10,05 \pm 7,44$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $27,90 \pm 16,96$ ), verifica-se que há diferença estatisticamente significativa (n=28; \*\*\*p<0,001; Figura 27 B). O mesmo se verificou ao comparar a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $10,66 \pm 7,62$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $29,98 \pm 15,30$ ; n=18; \*\*\*p<0,001; Figura 27 C). Em relação à percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $30,43 \pm 16,78$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $29,98 \pm 15,30$ ), não há diferença estatisticamente significativa (n=18; Figura 27 D).



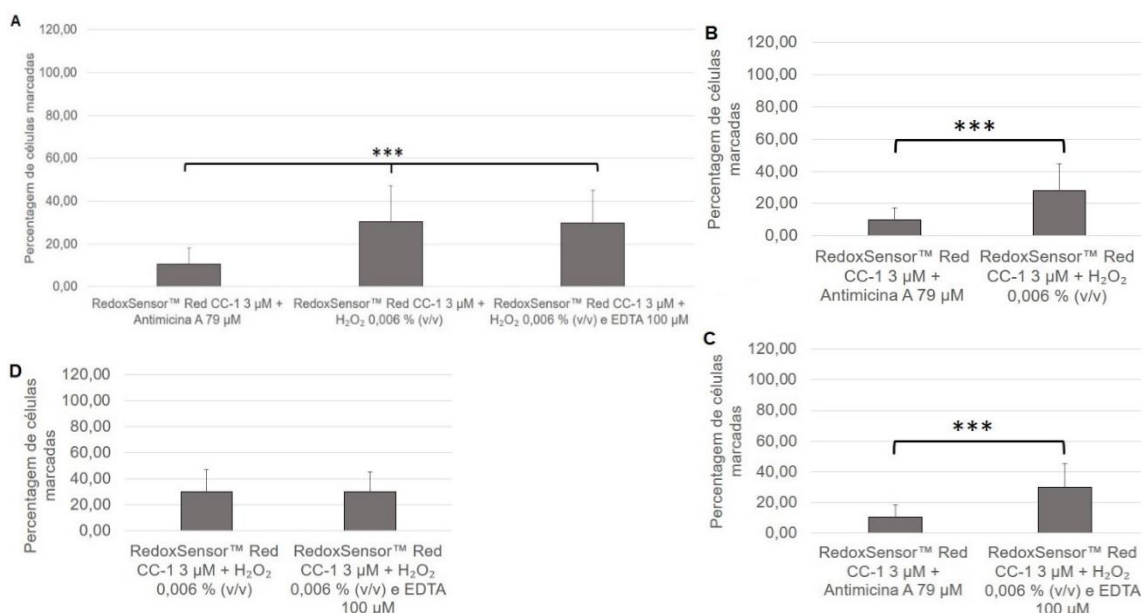


Fig. 27 - Avaliação da percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A, RedoxSensor™ Red CC-1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=18, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=28, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=18, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=18, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

No gráfico da Figura 28 A procurou-se comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 (5,72 ± 1,49), RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A (6,03 ± 2,01), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,68 ± 2,63), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (9,71 ± 5,32). Entre estas quatro condições há diferença estatisticamente significativa (n=18; \*\*\*p<0,001; Figura 28 A). Nas condições onde se utiliza como controlo positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA, verifica-se sempre um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas RedoxSensor™ Red CC-1. O mesmo não se verifica quando se utiliza a Antimicina A.

Comparando cada caso com a condição inicial, não há diferença estatisticamente significativa (n=29; Figura 28 B) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 (5,70 ± 1,75) com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A (5,96 ± 2,16). Em relação à intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 (5,87 ± 1,92) com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,94 ± 3,49) verifica-se que há diferença estatisticamente significativa (n=31; \*\*\*p<0,001; Figura 28 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa (n=18;

\*\*\* $p < 0,001$ ; Figura 28 D) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 ( $5,72 \pm 1,49$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $9,71 \pm 5,32$ ).

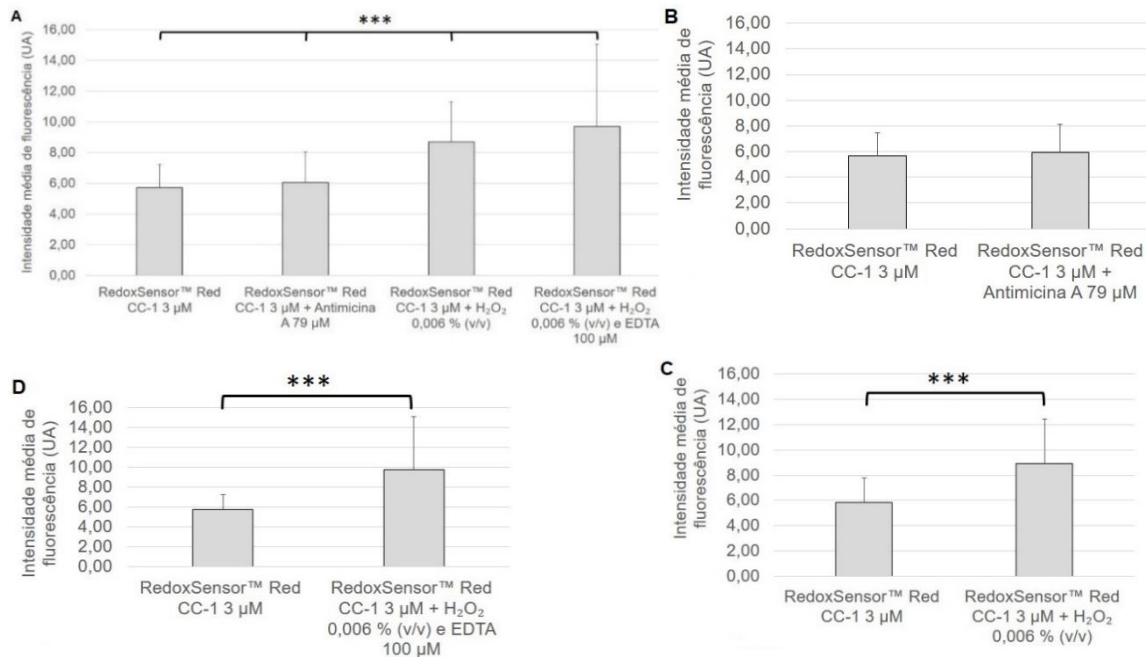


Fig. 28 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1, RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A, RedoxSensor™ Red CC-1 e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=18$ , A). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $n=29$ , B). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  ( $n=31$ , C). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=18$ , D). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*\* $p < 0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si (Figura 29 A) há diferença estatisticamente significativa ( $n=18$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $6,03 \pm 2,01$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  ( $8,68 \pm 2,63$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $9,71 \pm 5,32$ ). Ao comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $5,83 \pm 2,08$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  ( $8,35 \pm 2,65$ ) também se verifica que há diferença estatisticamente significativa ( $n=28$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Figura 29 B) e o mesmo acontece entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A ( $6,03 \pm 2,01$ ) com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $9,71 \pm 5,32$ ;  $n=18$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Figura 29 C). Não há diferença estatisticamente significativa ( $n=18$ ; Figura 29 D) entre a intensidade média de



fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,68 ± 2,63) com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (9,71 ± 5,32).

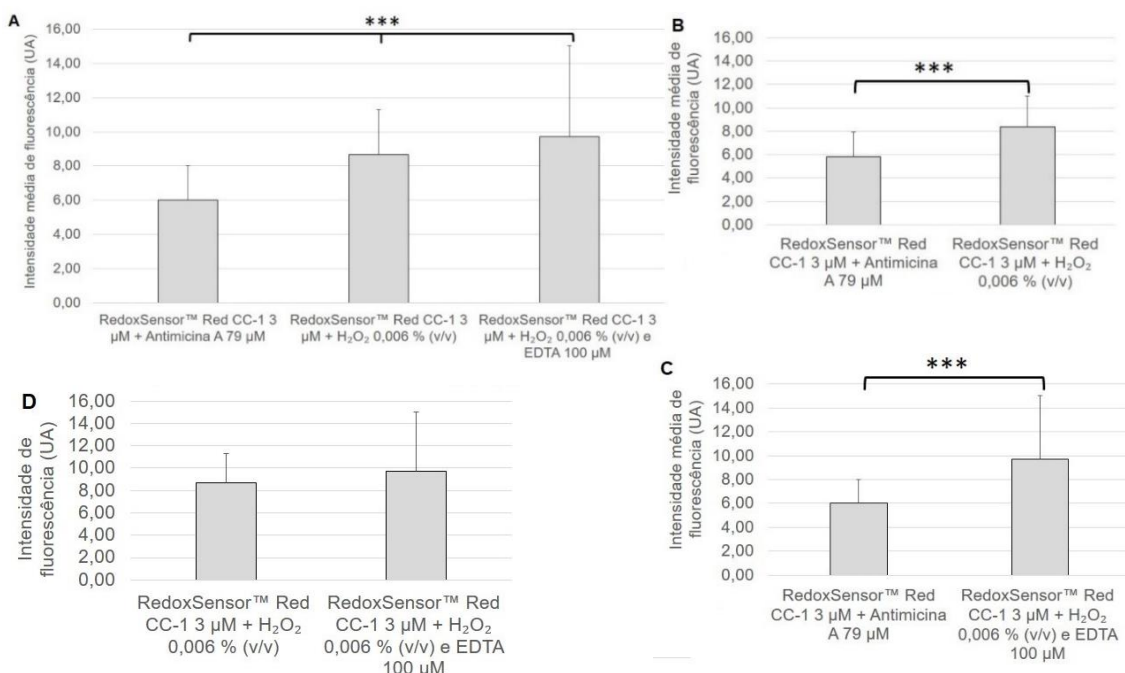


Fig. 29 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A, RedoxSensor™ Red CC-1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=18, **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=28, **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e Antimicina A com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=18, **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com RedoxSensor™ Red CC-1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=18, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

### 3.1.5 CellROX® Orange Reagent

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda CellROX® Orange Reagent apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 30). Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com os controlos positivos (Antimicina A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais EDTA). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).

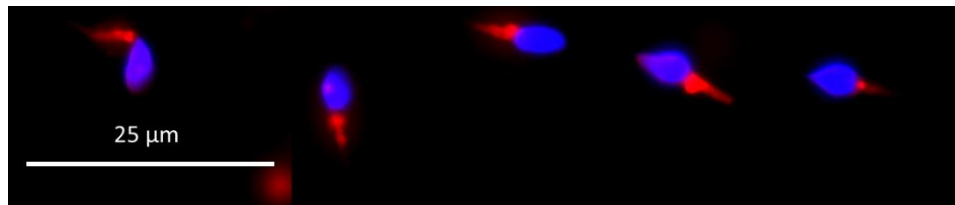


Fig. 30 - Avaliação da marcação da sonda CellROX® Orange Reagent no espermatozoide. Imagem representativa de cinco espermatozoides cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda CellROX® Orange Reagent a 1  $\mu$ M apresenta marcação na peça intermédia dos espermatozoides (vermelho). Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, procurou-se verificar se havia interferência do PBS suplementado com a sonda CellROX® Orange Reagent sem a presença de espermatozoides. Averiguou-se também se os controlos positivos juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides, mas sem a sonda, levavam ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de controlos positivos juntamente com a sonda CellROX® Orange Reagent foi essencial para se perceber a que ROS é que esta sonda é sensível. Na Figura 31 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 31 A), com marcação de CellROX® Orange Reagent (Figura 31 B), com marcação de CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (Figura 31 C), com marcação de CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 31 D), e, por fim, com marcação de CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (Figura 31 E).

No histograma da Figura 31 B há uma população situada na região onde não há marcação e outra na região onde há marcação. Da Figura 31 B para a Figura 31 C ocorreu uma notória diminuição da população localizada na região onde há marcação e um aumento da população situada na região onde não há marcação. Da Figura 31 B para a Figura 31 D verifica-se que deixa de existir a população localizada na região onde não há marcação, ocorrendo um notório aumento da população localizada na região onde há marcação. O mesmo se verifica para da Figura 31 B para a Figura 31 E. De notar que os histogramas da Figura 31 D e E são semelhantes.

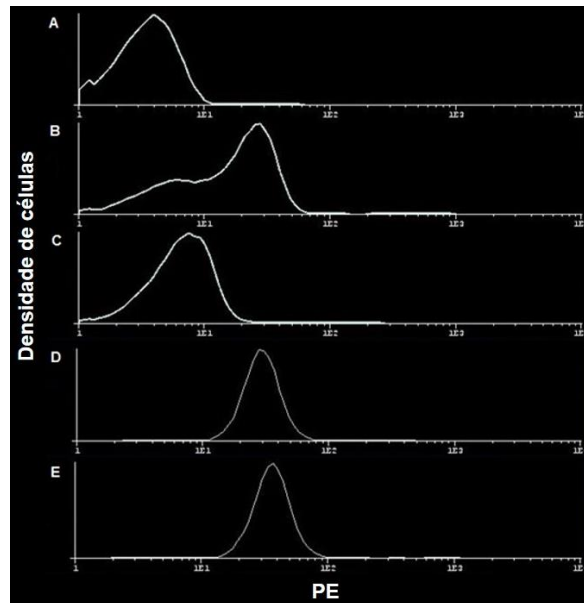


Fig. 31 - CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de CellROX® Orange Reagent a 1  $\mu$ M (B), com marcação de CellROX® Orange Reagent a 1  $\mu$ M e Antimicina A a 79  $\mu$ M (C), com marcação de CellROX® Orange Reagent a 1  $\mu$ M e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 0,006 % (v/v; D), e com marcação de CellROX® Orange Reagent a 1  $\mu$ M e  $H_2O_2$  a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 100  $\mu$ M (E).

Através do gráfico da Figura 32 A é possível constatar que há diferença estatisticamente significativa ( $n=13$ ;  $***p<0,001$ ) entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent ( $57,29 \pm 22,56$ ), CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $15,62 \pm 10,16$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $90,04 \pm 21,05$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $93,12 \pm 14,74$ ). Nas condições em que se utiliza como controlo positivo  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA, verifica-se sempre um aumento da percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas CellROX® Orange Reagent. O oposto verifica-se quando se utiliza a Antimicina A.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=31$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 32 B) entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent ( $63,94 \pm 22,98$ ) com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $19,97 \pm 16,22$ ). Entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent ( $64,74 \pm 19,33$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $93,47 \pm 14,63$ ) também se verificou uma diferença estatisticamente significativa ( $n=33$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 32 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=13$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 32 D) entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent ( $57,29 \pm 22,56$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $93,12 \pm 14,74$ ).

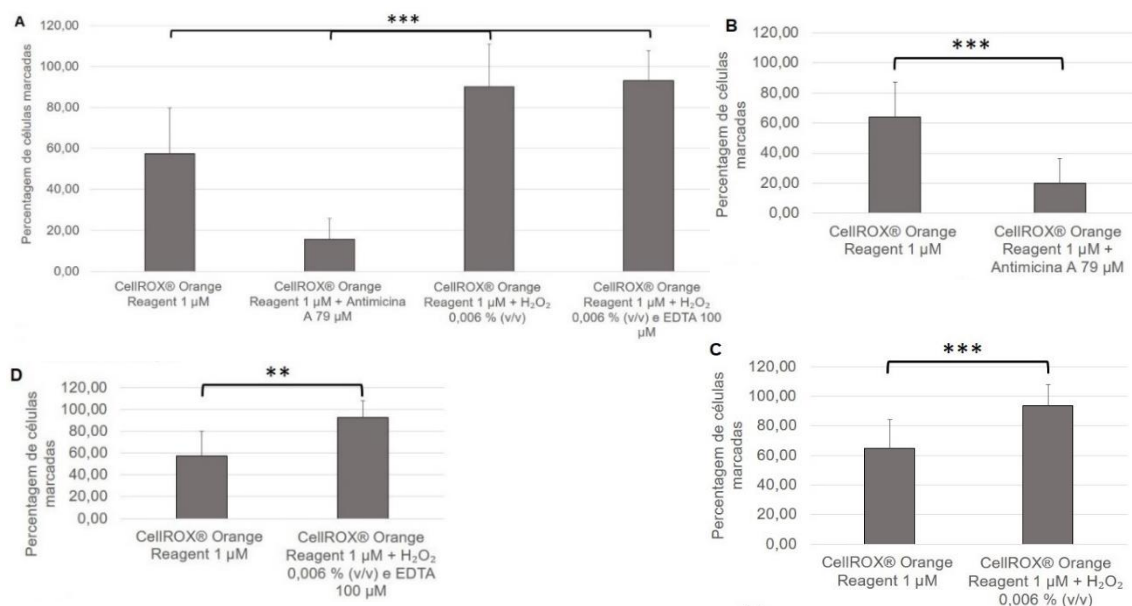


Fig. 32 - Avaliação da percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent, CellROX® Orange Reagent e Antimicina A, CellROX® Orange Reagent e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=13, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (n=31, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=33, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=13, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

Comparando os três controlos positivos entre si: CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (15,62 ± 10,16), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (90,04 ± 21,05), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (93,12 ± 14,74), há diferença estatisticamente significativa (n=13; \*\*\*p<0,001; Figura 33 A) na percentagem de células marcadas. Ao comparar-se a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (20,78 ± 16,38) com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (94,56 ± 14,72), verifica-se que também há diferença estatisticamente significativa (n=29; \*\*\*p<0,001; Figura 33 B). O mesmo se verificou ao comparar a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (15,62 ± 10,16) com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (93,12 ± 14,74; n=13; \*\*p<0,01; Figura 33 C). Em relação à percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (90,04 ± 21,05) com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (93,12 ± 14,74), não há diferença estatisticamente significativa (n=13; Figura 33 D).

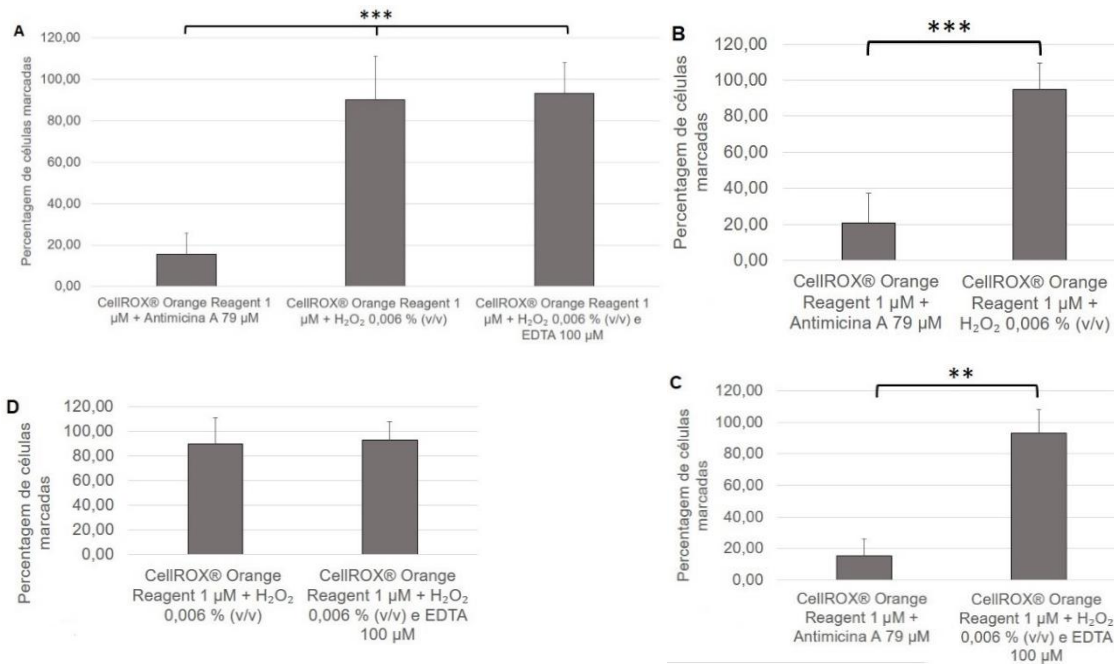


Fig. 33 - Avaliação da percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A, CellROX® Orange Reagent e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=13, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=29, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=13, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=13, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

No gráfico da Figura 34 A procurou-se comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent (16,57 ± 6,32), CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (7,22 ± 2,72), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33,65 ± 20,04), CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (35,78 ± 13,29). Entre estas quatro condições há diferença estatisticamente significativa (n=13; \*\*\*p<0,001; Figura 34 A). Nas condições onde se utiliza como controlo positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA, verifica-se sempre um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas CellROX® Orange Reagent. O oposto verifica-se quando se utiliza a Antimicina A.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa (n=31; \*\*\*p<0,001; Figura 34 B) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent (22,11 ± 24,90) com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A (8,02 ± 2,36). Em relação à intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent (17,97 ± 5,43) com CellROX® Orange Reagent e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (36,23 ± 16,59) verifica-se que há diferença estatisticamente significativa (n=33; \*\*\*p<0,001;

Figura 34 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=13$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 34 D) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent ( $16,57 \pm 6,32$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $35,78 \pm 13,29$ ).

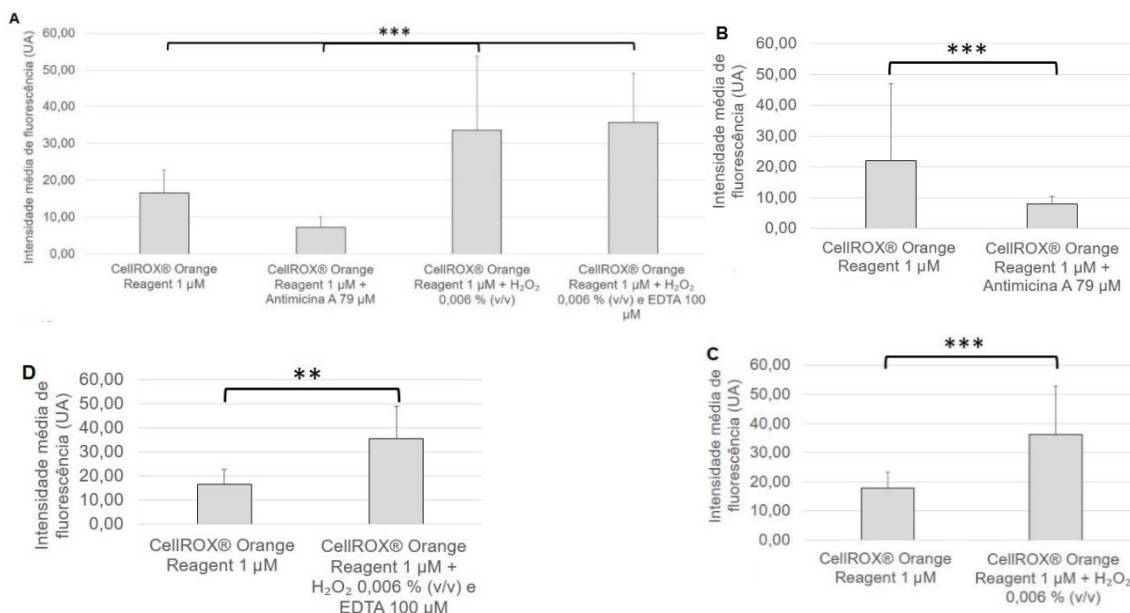


Fig. 34 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent, CellROX® Orange Reagent e Antimicina A, CellROX® Orange Reagent e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=13$ , A). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $n=31$ , B). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $n=33$ , C). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=13$ , D). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si (Figura 35 A) há diferença estatisticamente significativa ( $n=13$ ;  $***p<0,001$ ) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $7,22 \pm 2,72$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $33,65 \pm 20,04$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $35,78 \pm 13,29$ ). Ao comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $7,81 \pm 2,30$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $36,23 \pm 15,13$ ) também se verifica que há diferença estatisticamente significativa ( $n=29$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 35 B) e o mesmo acontece entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A ( $7,22 \pm 2,72$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $35,78 \pm 13,29$ ;  $n=13$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 35 C). Entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com



CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $33,65 \pm 20,04$ ) com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $35,78 \pm 13,29$ ) há diferença estatisticamente significativa ( $n=13$ ;  $*p<0,05$ ; Figura 35 D).

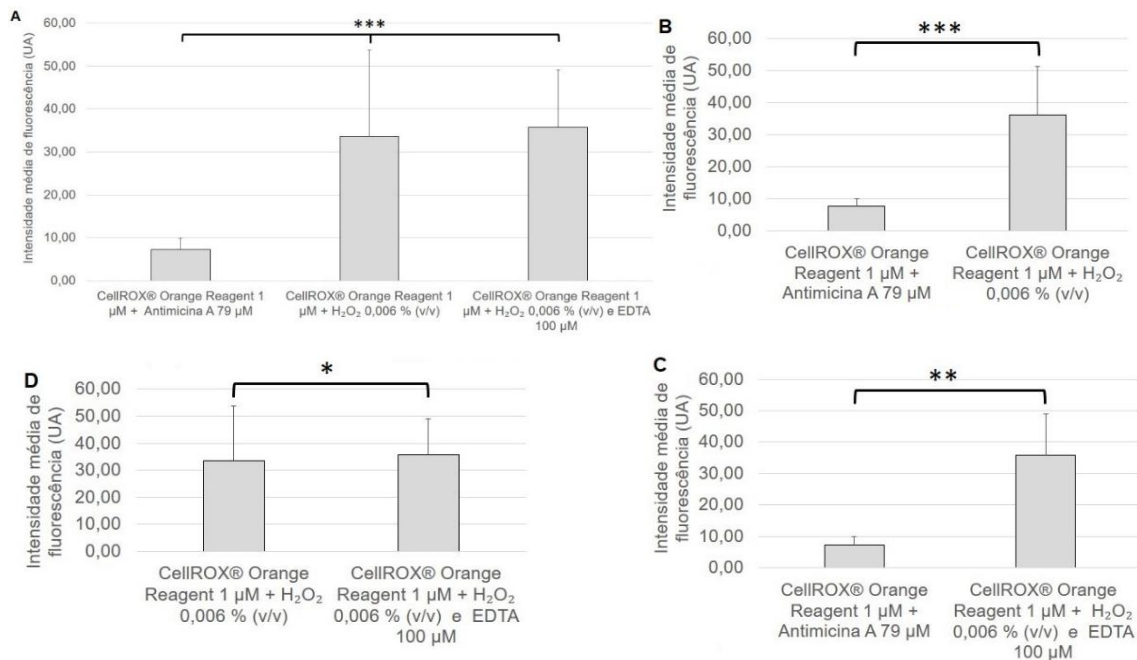


Fig. 35 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A, CellROX® Orange Reagent e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=13$ , A). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  ( $n=29$ , B). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e Antimicina A com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=13$ , C). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=13$ , D). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.6 MitoPY1

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda MitoPY1 apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 36). Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com os controlos positivos (Antimicina A,  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$  mais EDTA). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).



Fig. 36 - Avaliação da marcação da sonda MitoPY1 no espermatozoide. Imagem representativa de três espermatozoides cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda MitoPY1 a 10  $\mu$ M apresenta marcação na peça intermédia dos espermatozoides (verde). Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, procurou-se verificar se havia interferência do PBS suplementado com a sonda MitoPY1 sem a presença de espermatozoides. Averiguou-se também se os controlos positivos juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides, mas sem a sonda, levavam ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de controlos positivos juntamente com a sonda MitoPY1 foi essencial para se perceber a que ROS é que esta sonda é sensível. Na Figura 37 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 37 A), com marcação de MitoPY1 (Figura 37 B), com marcação de MitoPY1 e Antimicina A (Figura 37 C), com marcação de MitoPY1 e  $H_2O_2$  (Figura 37 D), e, por fim, com marcação de MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 37 E).

No histograma da Figura 37 B existe uma população localizada na região onde há marcação. Da Figura 37 B para a Figura 37 C a população passou a localizar-se tanto na região onde não há marcação, como na região onde há marcação. Da Figura 37 B para a Figura 37 D a população passou a localizar-se somente na região onde há marcação, estando deslocada para uma região com maior intensidade de fluorescência e o mesmo se verifica para da Figura 37 B para a Figura 37 E. De facto, os histogramas da Figura 37 D e E são semelhantes.



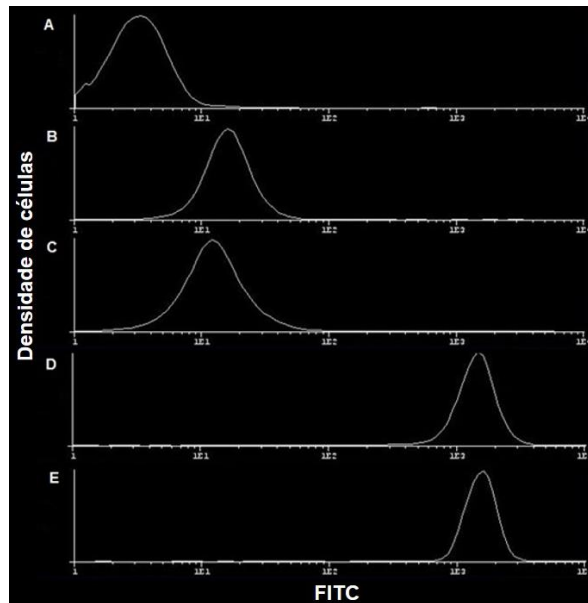


Fig. 37 - MitoPY1 e os controlos positivos. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de MitoPY1 a 10  $\mu$ M (B), com marcação de MitoPY1 a 10  $\mu$ M e Antimicina A a 79  $\mu$ M (C), com marcação de MitoPY1 a 10  $\mu$ M e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 0,006 % (v/v; D), e com marcação de MitoPY1 a 10  $\mu$ M e  $H_2O_2$  a 0,006 % (v/v) juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 100  $\mu$ M (E).

Através do gráfico da Figura 38 A é possível constatar que há diferença estatisticamente significativa ( $n=14$ ;  $***p<0,001$ ) entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 ( $89,10 \pm 19,11$ ), MitoPY1 e Antimicina A ( $83,52 \pm 16,24$ ), MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $99,90 \pm 0,06$ ), MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $99,90 \pm 0,07$ ). Nas condições em que se utiliza como controlo positivo  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA, verifica-se sempre um aumento da percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas MitoPY1. O oposto verifica-se quando se utiliza a Antimicina A.

Comparando cada caso com a condição inicial, há diferença estatisticamente significativa ( $n=28$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 38 B) entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 ( $92,76 \pm 14,74$ ) com MitoPY1 e Antimicina A ( $86,49 \pm 14,79$ ). Entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 ( $88,33 \pm 23,02$ ) e com MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $99,66 \pm 1,08$ ) também se verificou uma diferença estatisticamente significativa ( $n=30$ ;  $***p<0,001$ ; Figura 38 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa ( $n=14$ ;  $**p<0,01$ ; Figura 38 D) entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 ( $89,10 \pm 19,11$ ) com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $99,90 \pm 0,07$ ).

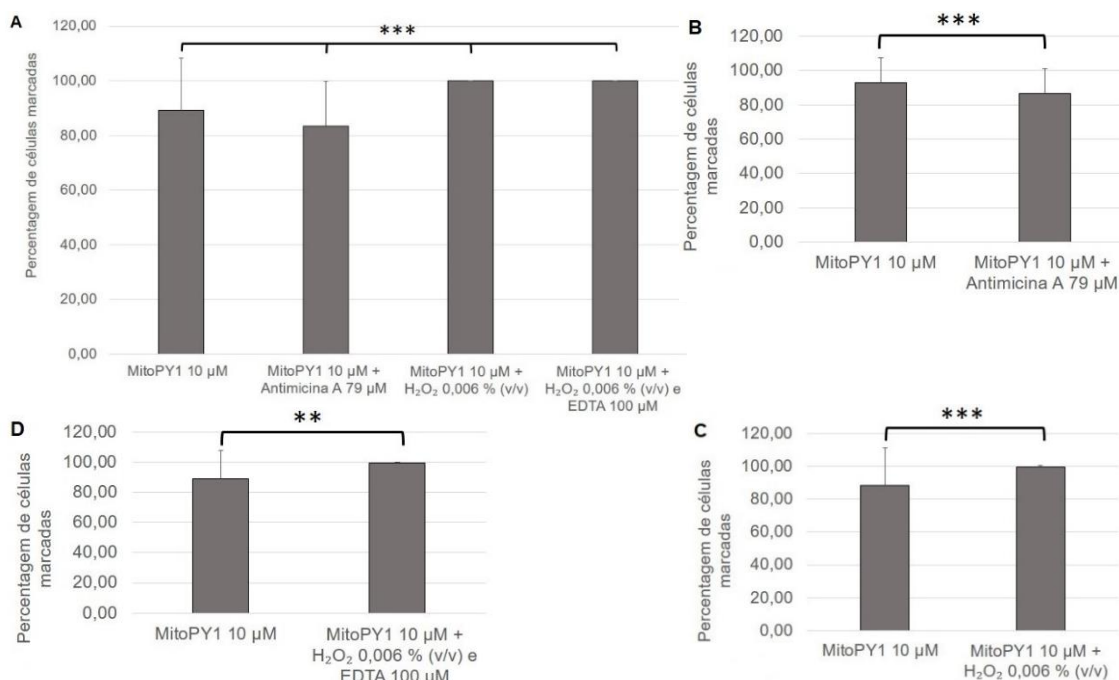


Fig. 38 - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoPY1 e com MitoPY1 e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1, MitoPY1 e Antimicina A, MitoPY1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=14, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 com MitoPY1 e Antimicina A (n=28, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=30, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=14, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

Comparando os três controlos positivos entre si: MitoPY1 e Antimicina A (83,52 ± 16,24), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (99,90 ± 0,06), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (99,90 ± 0,07) há diferença estatisticamente significativa (n=14; \*\*\*p<0,001; Figura 39 A) na percentagem de células marcadas. Ao comparar-se a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e Antimicina A (86,49 ± 14,79) com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (99,90 ± 0,09), verifica-se que também há diferença estatisticamente significativa (n=28; \*\*\*p<0,001; Figura 39 B). O mesmo se verificou ao comparar a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e Antimicina A (83,52 ± 16,24) com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (99,90 ± 0,07; n=14; \*\*p<0,01; Figura 39 C). Em relação à percentagem de células marcadas com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (99,90 ± 0,06) com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (99,90 ± 0,07), não há diferença estatisticamente significativa (n=14; Figura 39 D).

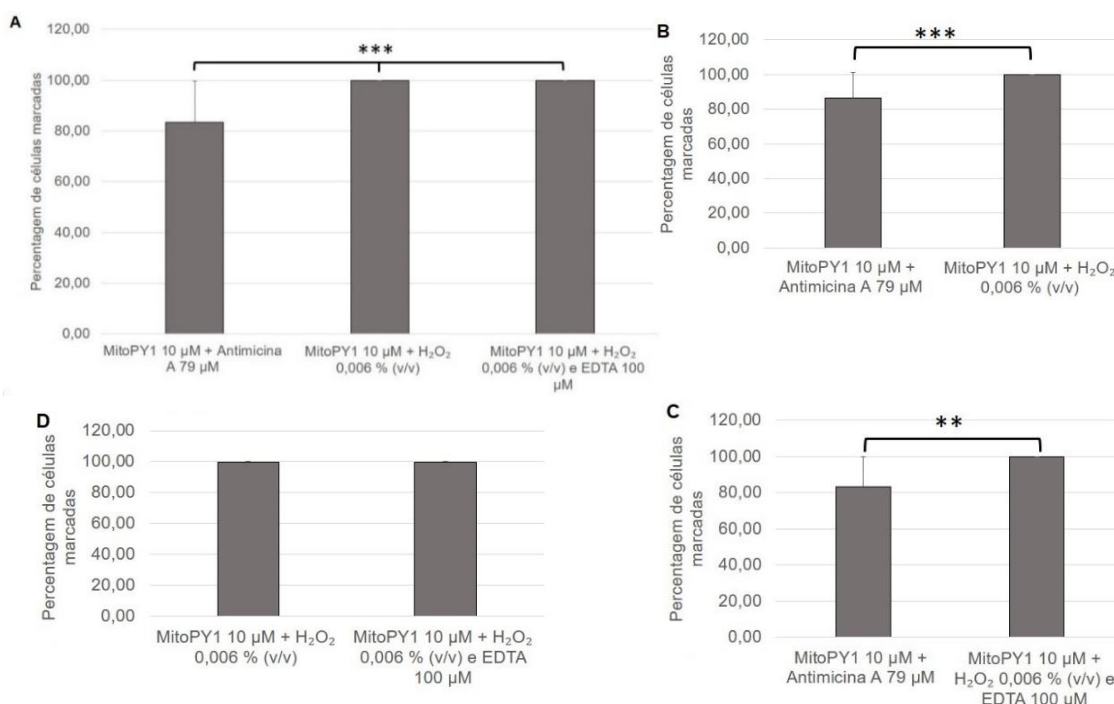


Fig. 39 - Avaliação da percentagem de células marcadas com MitoPY1 e os controlos positivos. Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e Antimicina A, MitoPY1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=14, **A**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e Antimicina A com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=28, **B**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e Antimicina A com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=14, **C**). Comparação entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=14, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão.

No gráfico da Figura 40 A procurou-se comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 ( $23,11 \pm 10,77$ ), MitoPY1 e Antimicina A ( $21,80 \pm 10,08$ ), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $1288,01 \pm 481,60$ ), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA ( $1315,83 \pm 406,97$ ). Entre estas quatro condições há diferença estatisticamente significativa (n=14; \*\*\*p<0,001; Figura 40 A). Nas condições onde se utiliza como controlo positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA, verifica-se sempre um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas MitoPY1. O mesmo não se verifica quando se utiliza a Antimicina A.

Comparando cada caso com a condição inicial, não há diferença estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 ( $25,70 \pm 10,70$ ) com MitoPY1 e Antimicina A ( $25,34 \pm 15,02$ ; n=28, Figura 40 B). Em relação à intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 ( $24,61 \pm 11,14$ ) com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $1209,64 \pm 520,16$ ) verifica-se que há diferença estatisticamente significativa (n=30; \*\*\*p<0,001; Figura 40 C). Por último, há diferença estatisticamente significativa (n=14; \*\*p<0,01; Figura 40 D) entre a intensidade média de fluorescência da população

de espermatozoides marcada com MitoPY1 ( $23,11 \pm 10,77$ ) com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $1315,83 \pm 406,97$ ).

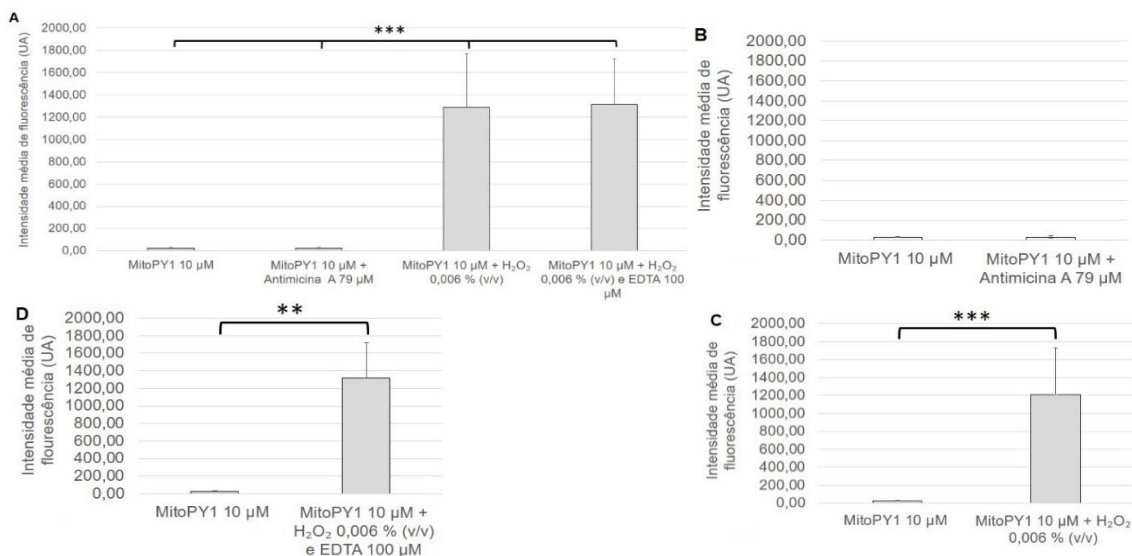


Fig. 40 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e com MitoPY1 e os controlos positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1, MitoPY1 e Antimicina A, MitoPY1 e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA,  $n=14$ , **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 com MitoPY1 e Antimicina A ( $n=28$ , **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 com MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $n=30$ , **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $n=14$ , **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos positivos entre si (Figura 41 A), há diferença estatisticamente significativa ( $n=14$ ; \*\*\* $p<0,001$ ) entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A ( $21,80 \pm 10,08$ ), MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $1288,01 \pm 481,60$ ), MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $1315,83 \pm 406,97$ ). Ao comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A ( $25,34 \pm 15,02$ ) com MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $1285,11 \pm 449,45$ ) também se verifica que há diferença estatisticamente significativa ( $n=28$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; Figura 41 B) e o mesmo acontece entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A ( $21,80 \pm 10,08$ ) com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $1315,83 \pm 406,97$ ;  $n=14$ ; \*\* $p<0,01$ ; Figura 41 C). Entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e  $H_2O_2$  ( $1288,01 \pm 481,60$ ) com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA ( $1315,83 \pm 406,97$ ) não há diferença estatisticamente significativa ( $n=14$ ; Figura 41 D).

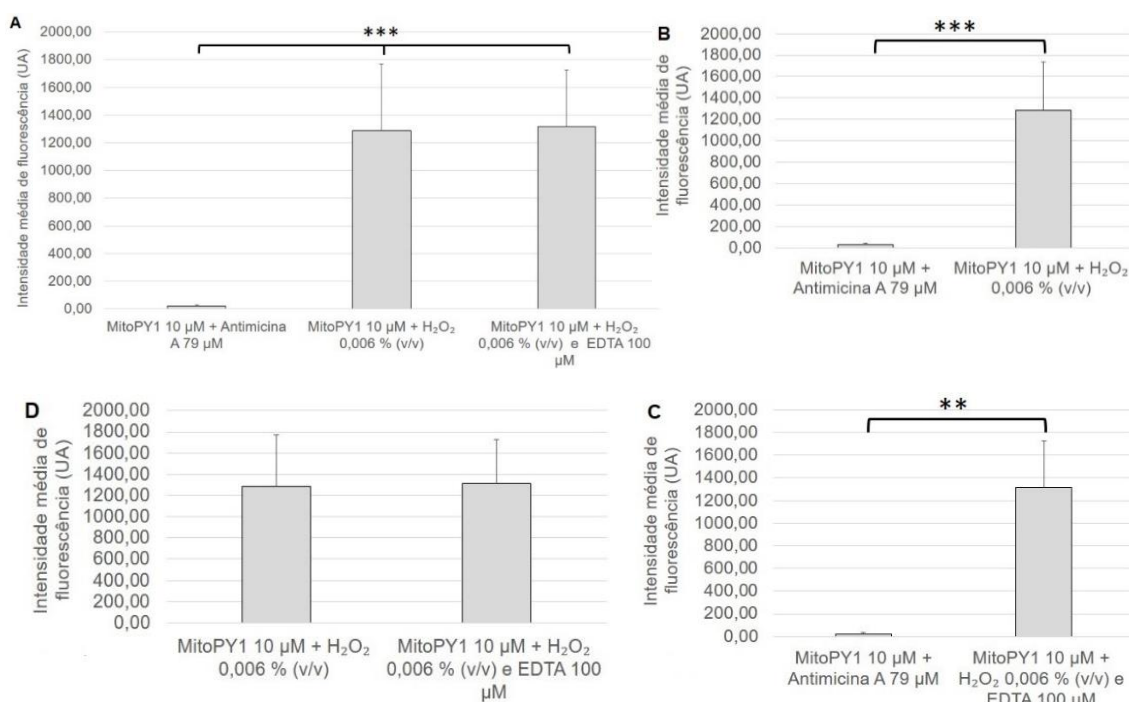


Fig. 41 - Avaliação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e os controles positivos. Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A, MitoPY1 e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, n=14, **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (n=28, **B**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e Antimicina A com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=14, **C**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoPY1 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (n=14, **D**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Os resultados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão. As concentrações de cada composto constam nos gráficos.

### 3.1.7 DAF-2 DA

Através de microscopia de epifluorescência, constatou-se que a sonda DAF-2 DA apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 42). Procurou-se ainda averiguar se haveria uma mudança no local da marcação da sonda caso fosse adicionada às suspensões celulares juntamente com o controlo positivo (Espermína). Não houve diferença no local da marcação (dados não apresentados).



Fig. 42 - Avaliação da marcação da sonda DAF-2 DA no espermatozoide. Imagem representativa de quatro espermatozoides cujos núcleos estão marcados com uma sonda fluorescente que se liga ao DNA, Hoechst (azul), sendo que a sonda DAF-2 DA a 1 µM apresenta marcação na peça intermédia dos espermatozoides (verde). Ampliação total 1000x.

Através de citometria de fluxo, procurou-se verificar se havia interferência do PBS suplementado com a sonda DAF-2 DA sem a presença de espermatozoides.

Averiguou-se também se o controlo positivo juntamente com a sonda de fluorescência, na ausência de espermatozoides, ou juntamente com os espermatozoides, mas sem a sonda, levava ao aparecimento de algum tipo de interferência. Nenhuma interferência foi encontrada (dados não apresentados).

Como já foi descrito no Capítulo 2, a utilização de Espermina juntamente com a sonda DAF-2 DA foi essencial para se perceber se de facto esta sonda é sensível a óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ). Na Figura 43 estão representados os histogramas relativos à análise por citometria de fluxo de uma amostra de espermatozoides sem marcação (apenas em PBS suplementado; Figura 43 A), com marcação de DAF-2 DA (Figura 43 B) e com marcação de DAF-2 DA e Espermina (Figura 43 C).

O histograma da Figura 43 B é composto por uma população situada na região onde há marcação. Da Figura 43 B para a Figura 43 C, a população permanece na região onde há marcação, no entanto esta encontra-se deslocada para uma região onde a intensidade de fluorescência é maior.

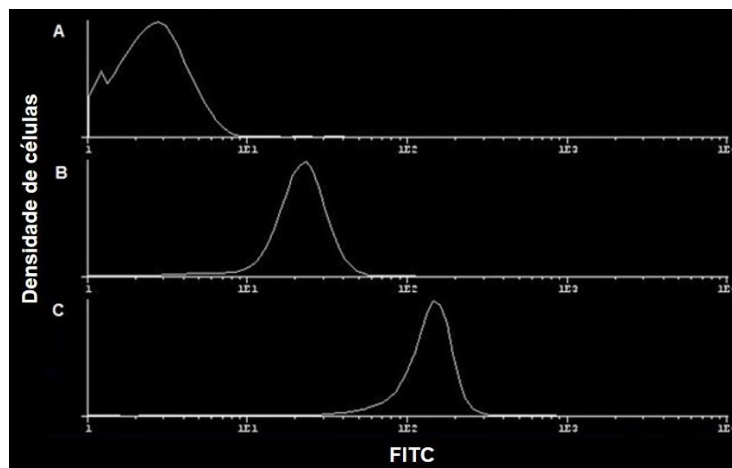


Fig. 43 - DAF-2 DA e o controlo positivo. Histogramas obtidos após a análise de uma amostra de espermatozoides no citómetro de fluxo: sem marcação (A), com marcação de DAF-2 DA a 1  $\mu\text{M}$  (B) e com marcação de DAF-2 DA a 1  $\mu\text{M}$  e Espermina a 50  $\mu\text{M}$  (C).

Através do gráfico da Figura 44 A, é possível constatar que há diferença estatisticamente significativa ( $n=28$ ;  $***p<0,001$ ) entre a percentagem de células marcadas com DAF-2 DA ( $87,38 \pm 8,86$ ) com DAF-2 DA e Espermina ( $98,99 \pm 1,28$ ), verificando-se um aumento da percentagem de células marcadas em relação à primeira condição - apenas DAF-2 DA.



No gráfico da Figura 44 B, procurou-se comparar a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DAF-2 DA ( $33,60 \pm 7,03$ ) com DAF-2 DA e Espermina ( $125,10 \pm 47,43$ ), havendo diferença estatisticamente significativa ( $n=28$ ;  $***p<0,001$ ), verificando-se um aumento da intensidade média de fluorescência em relação à primeira condição - apenas DAF-2 DA.

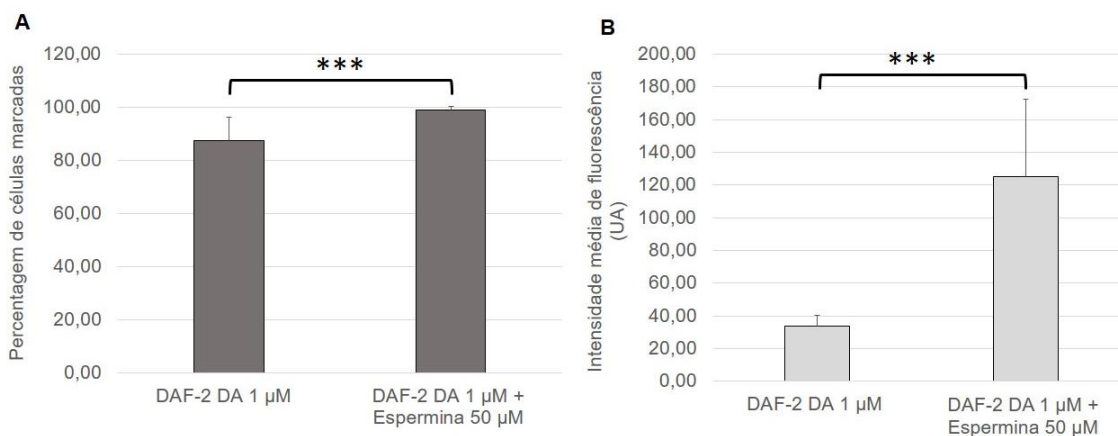


Fig. 44 - Avaliação da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DAF-2 DA e com DAF-2 DA e o controlo positivo. Comparação entre a percentagem de células marcadas com DAF-2 DA com DAF-2 DA e Espermina ( $n=18$ , **A**). Comparação entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com DAF-2 DA com DAF-2 DA e Espermina ( $n=28$ , **B**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $***p<0,001$ . Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.1.8 Correlações Entre as Sondas Fluorescentes

De forma a caracterizar cada sonda fluorescente, procurou-se averiguar se existia alguma correlação entre as várias sondas.

A Tabela 2 A refere-se às correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, DHE e DAF-2 DA. Não foram obtidas correlações com a sonda MitoPY1.

A sonda MitoSOX™ Red correlaciona-se positivamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 ( $r=0,466$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=34$ ) e com a sonda DHE ( $r=0,753$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=44$ ). No entanto, a sonda MitoSOX™ Red correlaciona-se negativamente com a sonda DAF-2 DA ( $r= -0,588$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=22$ ).

A sonda CellROX® Orange Reagent correlaciona-se positivamente com a sonda DAF-2 DA ( $r=0,685$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=28$ ) e negativamente com a sonda DHE ( $r= -0,564$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=35$ ).

A sonda DAF-2 DA correlaciona-se positivamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 ( $r=0,593$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=17$ ), e negativamente com a sonda DHE ( $r= -0,719$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=22$ ).

A Tabela 2 B refere-se às correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA. Não foram obtidas correlações com a sonda CellROX® Orange Reagent.

A sonda MitoSOX™ Red correlaciona-se positivamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 ( $r=0,365$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=34$ ), com a sonda MitoPY1 ( $r=0,404$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=26$ ) e com a sonda DHE ( $r=0,754$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=44$ ). Porém, correlaciona-se negativamente com a sonda DAF-2 DA ( $r= -0,537$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=22$ ).

Tabela 2 - Correlações entre as sondas fluorescentes. Correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, DHE e DAF-2 DA (A). Correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA (B). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ .

A	RedoxSensor™ Red CC-1 3 µM	CellROX® Orange Reagent 1 µM	DHE 50 nM	DAF-2 DA 1 µM
MitoSOX™ Red 1 µM	$r=0,466$ $**p<0,01$ $n=34$	-	$r=0,753$ $***p<0,001$ $n=44$	$r= -0,588$ $**p<0,01$ $n=22$
RedoxSensor™ Red CC-1 3 µM	-	-	-	$r=0,593$ $*p<0,05$ $n=17$
DHE 50 nM	-	$r= -0,564$ $***p<0,001$ $n=35$	-	$r= -0,719$ $***p<0,001$ $n=22$
DAF-2 DA 1 µM	-	$r=0,685$ $***p<0,001$ $n=28$	-	-

B	RedoxSensor™ Red CC-1 3 µM	MitoPY1 10 µM	DHE 50 nM	DAF-2 DA 1 µM
MitoSOX™ Red 1 µM	$r=0,365$ $*p<0,05$ $n=34$	$r=0,404$ $*p<0,05$ $n=26$	$r=0,754$ $***p<0,001$ $n=44$	$r= -0,537$ $*p<0,05$ $n=22$

## 3.2 Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de Procriação Medicamente Assistida

### 3.2.1 Parâmetros de Qualidade Espermática

#### 3.2.1.1 Concentração Inicial de Espermatozoides

As Figuras 45 e 46 correspondem à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência,



respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a concentração inicial de espermatozoides nas amostras de ejaculado. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: normozoospermia - em que a concentração inicial de espermatozoides foi igual ou superior a 15 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado - e oligozoospermia - quando a concentração inicial de espermatozoides foi inferior a 15 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado (WHO, 2010; Capítulo 1, secção 1.1).

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a concentração e os indivíduos oligozoospermicos relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=74;  $41,06 \pm 18,89$ ), MitoSOX™ Red oligozoospermia (n=5;  $58,82 \pm 16,78$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=65;  $7,88 \pm 5,12$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 oligozoospermia (n=3;  $6,27 \pm 3,32$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=70;  $61,61 \pm 20,38$ ), CellROX® Orange Reagent oligozoospermia (n=3;  $34,54 \pm 18,70$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=69;  $93,65 \pm 13,88$ ), MitoPY1 oligozoospermia (n=2;  $96,50 \pm 2,16$ ), DHE normozoospermia (n=74;  $36,69 \pm 18,45$ ), DHE oligozoospermia (n=3;  $68,97 \pm 24,07$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=69;  $88,15 \pm 10,18$ ) e DAF-2 DA oligozoospermia (n=2;  $71,38 \pm 19,74$ ).

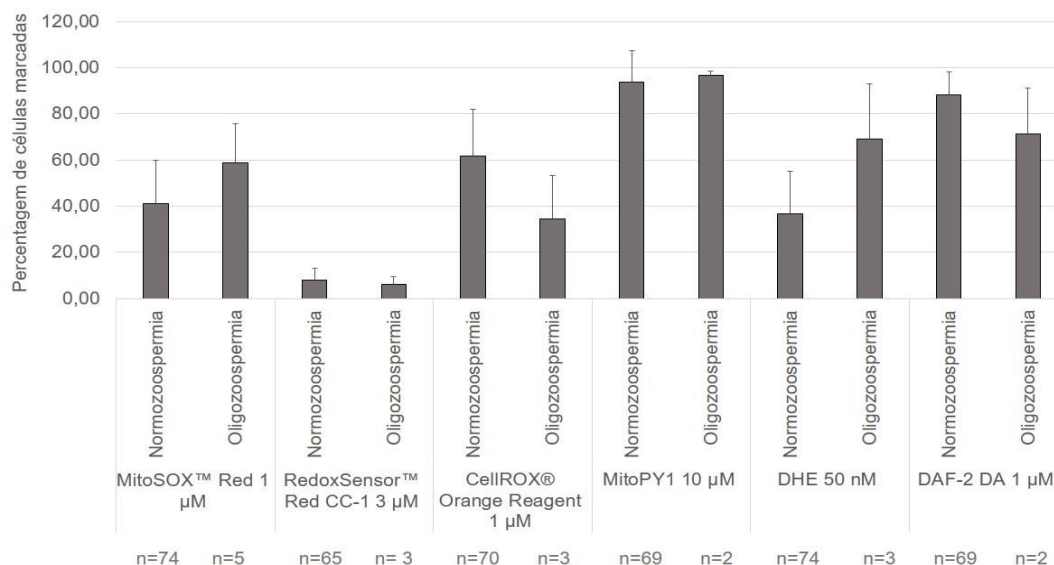


Fig. 45 - Sondas fluorescentes e a concentração inicial de espermatozoides. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a concentração inicial de espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou oligozoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a concentração e os indivíduos oligozoospermicos relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=74;  $134,61 \pm 82,96$ ), MitoSOX™ Red oligozoospermia (n=5;  $232,13 \pm 94,92$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=65;  $5,91 \pm 1,57$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 oligozoospermia (n=3;  $5,92 \pm 0,31$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=70;  $18,89 \pm 17,11$ ), CellROX® Orange Reagent oligozoospermia (n=3;  $9,69 \pm 5,20$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=69;  $29,38 \pm 10,93$ ), MitoPY1 oligozoospermia (n=2;  $23,60 \pm 6,50$ ), DHE normozoospermia (n=74;  $143,47 \pm 16,68$ ), DHE oligozoospermia (n=3;  $377,03 \pm 167,33$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=69;  $38,90 \pm 12,03$ ) e DAF-2 DA oligozoospermia (n=2;  $26,52 \pm 11,61$ ).

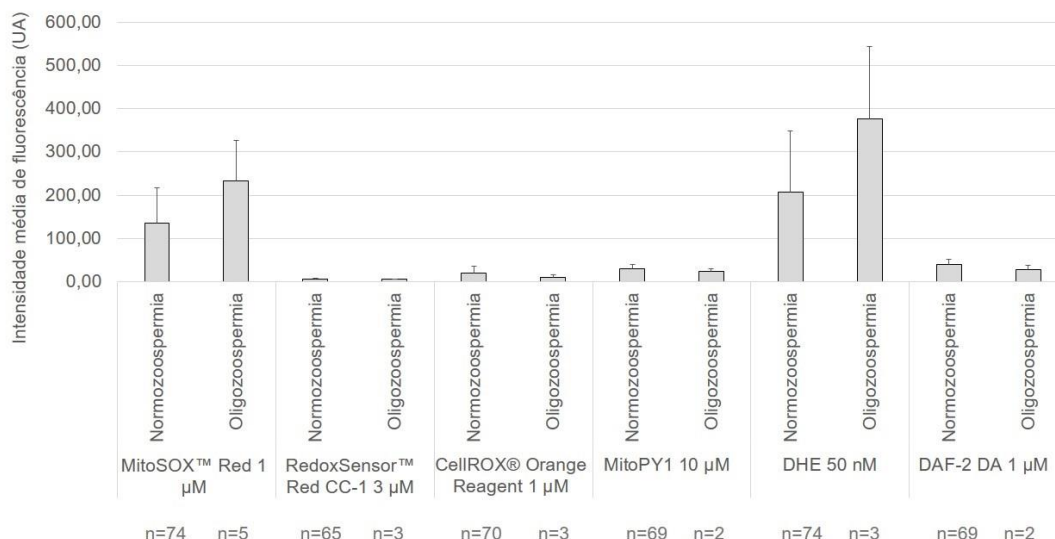


Fig. 46 - Sondas fluorescentes e a concentração inicial de espermatozoides. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a concentração inicial de espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou oligozoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.2 Motilidade Progressiva dos Espermatozoides

As Figuras 47 e 48 correspondem à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência, respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a motilidade progressiva dos espermatozoides nas amostras de ejaculado. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: normozoospermia – quando a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (rápida e lenta – A+B) foi igual ou superior a 32% - e astenozoospermia - em que a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (A+B) foi inferior a 32% (WHO, 2010; Capítulo 1, secção 1.1).

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a motilidade progressiva (A+B) e os indivíduos astenozoospermicos relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=58;  $42,02 \pm 18,06$ ), MitoSOX™ Red astenozoospermia (n=21;  $42,64 \pm 22,40$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=53;  $7,78 \pm 5,20$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 astenozoospermia (n=15;  $7,91 \pm 4,61$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=58;  $60,37 \pm 20,86$ ), CellROX® Orange Reagent astenozoospermia (n=15;  $60,95 \pm 21,78$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=55;  $92,70 \pm 15,39$ ), MitoPY1 astenozoospermia (n=16;  $97,27 \pm 2,21$ ), DHE normozoospermia (n=60;  $36,67 \pm 18,87$ ), DHE astenozoospermia (n=17;  $42,45 \pm 21,74$ ),

DAF-2 DA normozoospermia (n=57;  $87,85 \pm 11,61$ ) e DAF-2 DA astenoospermia (n=14;  $86,97 \pm 5,72$ ).

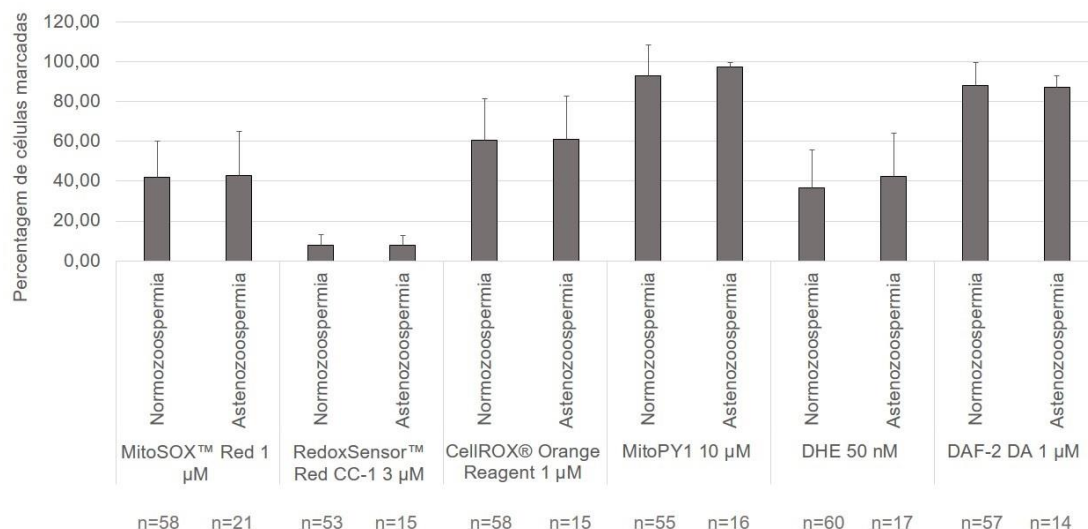


Fig. 47 - Sondas fluorescentes e a motilidade progressiva (rápida e lenta – A+B) dos espermatozoides. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a motilidade progressiva (A+B) dos espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou astenoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a motilidade progressiva (A+B) e os indivíduos astenoospermicos relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=58;  $132,98 \pm 76,74$ ), MitoSOX™ Red astenoospermia (n=21;  $162,30 \pm 108,16$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=53;  $5,81 \pm 1,39$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 astenoospermia (n=15;  $6,26 \pm 2,01$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=58;  $19,15 \pm 18,78$ ), CellROX® Orange Reagent astenoospermia (n=15;  $16,04 \pm 4,44$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=55;  $28,85 \pm 11,06$ ), MitoPY1 astenoospermia (n=16;  $30,45 \pm 10,32$ ), DHE normozoospermia (n=60;  $192,80 \pm 131,71$ ), DHE astenoospermia (n=17;  $284,07 \pm 178,33$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=57;  $39,81 \pm 10,68$ ) e DAF-2 DA astenoospermia (n=14;  $33,42 \pm 16,21$ ).

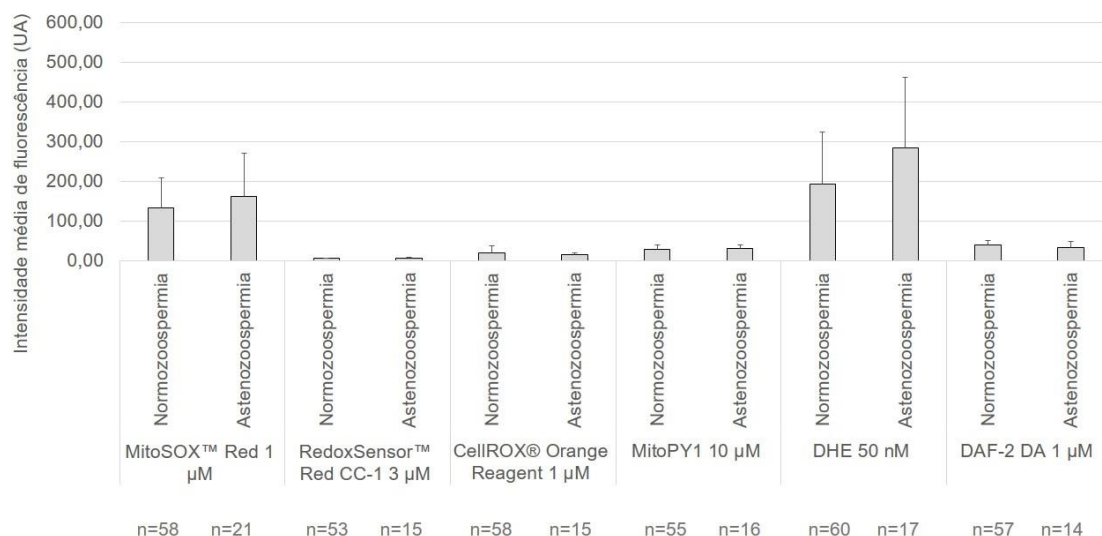


Fig. 48 - Sondas fluorescentes e a motilidade progressiva (rápida e lenta - A+B) dos espermatozoides. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a motilidade progressiva (A+B) dos espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou astenozoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.3 Morfologia dos Espermatozoides

As Figura 49 e 50 referem-se à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência, respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a morfologia dos espermatozoides nas amostras de ejaculado. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: normozoospermia - quando a percentagem de espermatozoides com morfologia normal foi igual ou superior a 4% - e teratozoospermia - em que a percentagem de espermatozoides com morfologia normal foi inferior a 4% (WHO, 2010; Capítulo 1, secção 1.1).

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a morfologia e os indivíduos teratozoospermicos relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=24;  $39,45 \pm 18,37$ ), MitoSOX™ Red teratozoospermia (n=22;  $39,37 \pm 18,29$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=17;  $6,69 \pm 3,87$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 teratozoospermia (n=16;  $7,54 \pm 6,13$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=25;  $64,56 \pm 21,51$ ), CellROX® Orange Reagent teratozoospermia (n=17;  $58,49 \pm 19,17$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=23;  $93,97 \pm 10,59$ ), MitoPY1 teratozoospermia (n=19;  $94,16 \pm 14,33$ ), DHE normozoospermia (n=23;  $35,04 \pm 16,55$ ), DHE teratozoospermia (n=22;  $36,87 \pm 19,65$ ), DAF-2 DA

normozoospermia (n=16;  $89,61 \pm 8,01$ ) e DAF-2 DA teratozoospermia (n=20;  $88,74 \pm 8,03$ ).

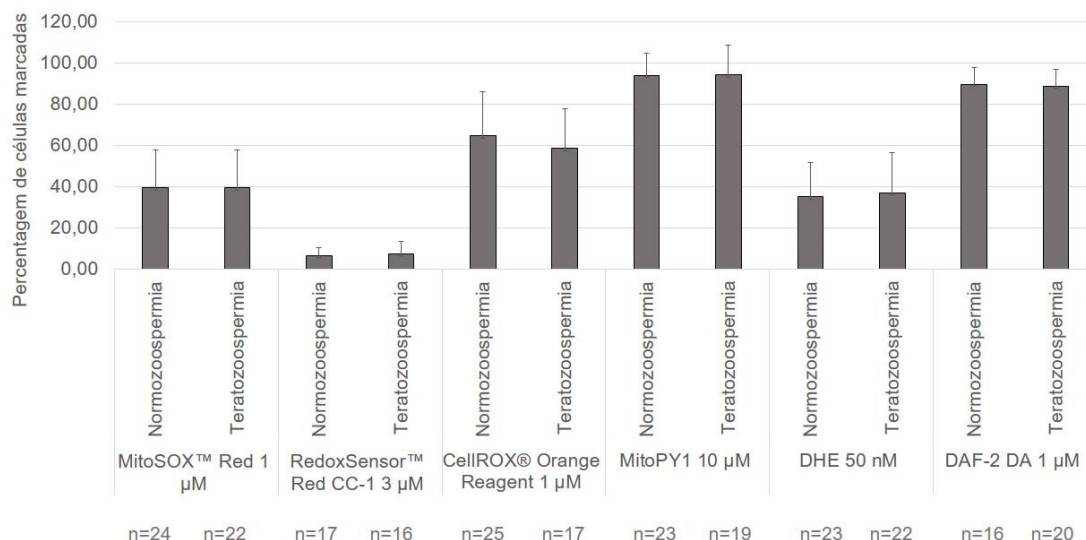


Fig. 49 - Sondas fluorescentes e a morfologia dos espermatozoides. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a morfologia dos espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou teratozoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a morfologia e os indivíduos teratozoospermicos relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=24;  $129,89 \pm 84,28$ ), MitoSOX™ Red teratozoospermia (n=22;  $125,72 \pm 57,92$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=17;  $5,46 \pm 1,67$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 teratozoospermia (n=16;  $5,84 \pm 1,74$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=25;  $21,99 \pm 27,78$ ), CellROX® Orange Reagent teratozoospermia (n=17;  $17,88 \pm 5,99$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=23;  $27,82 \pm 12,80$ ), MitoPY1 teratozoospermia (n=19;  $30,72 \pm 11,01$ ), DHE normozoospermia (n=23;  $234,42 \pm 189,89$ ), DHE teratozoospermia (n=22;  $195,95 \pm 117,64$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=16;  $37,65 \pm 15,00$ ) e DAF-2 DA teratozoospermia (n=20;  $35,98 \pm 9,24$ ).

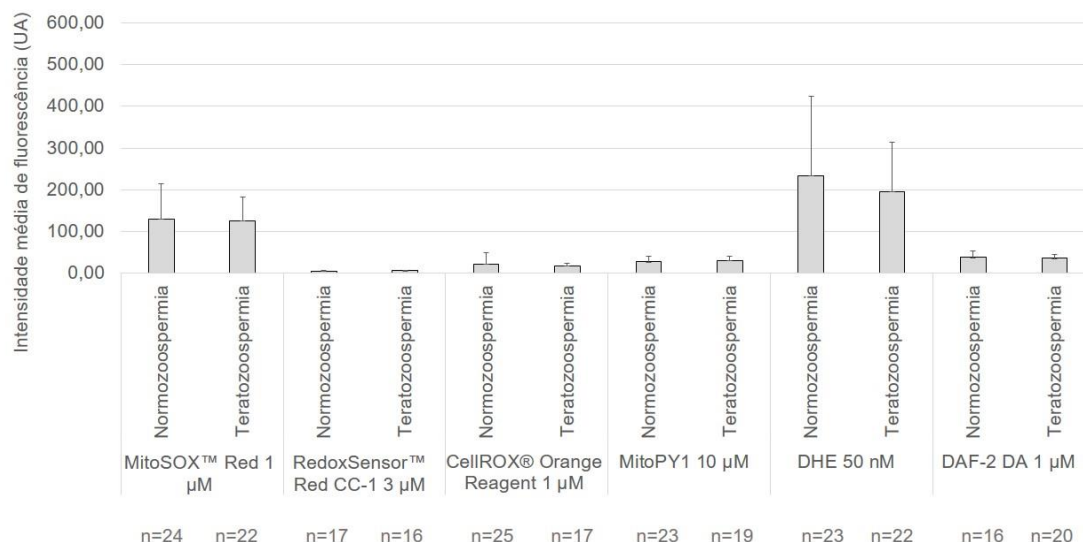


Fig. 50 - Sondas fluorescentes e a morfologia dos espermatozoides. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a morfologia dos espermatozoides. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou teratozoospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.4 Normozoospermia vs Não Normozoospermia

As Figuras 51 e 52 referem-se à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência, respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com os parâmetros de qualidade espermática. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: normozoospermia - quando nenhum dos parâmetros de qualidade espermática (concentração, motilidade e morfologia) se encontra fora dos valores normais - e “não normozoospermia” - em que um ou dois parâmetros de qualidade espermática estão alterados.

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos e os indivíduos não normozoospermicos relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=23; 40,57  $\pm$  17,94), MitoSOX™ Red não normozoospermia (n=23; 38,26  $\pm$  18,64), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=17; 6,69  $\pm$  3,87), RedoxSensor™ Red CC-1 não normozoospermia (n=16; 7,54  $\pm$  6,13), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=24; 64,12  $\pm$  21,86), CellROX® Orange Reagent não normozoospermia (n=18; 59,42  $\pm$  19,01), MitoPY1 normozoospermia (n=23; 93,97  $\pm$  10,59), MitoPY1 não normozoospermia (n=19; 94,16  $\pm$  14,33), DHE normozoospermia (n=22; 35,51  $\pm$  16,78), DHE não normozoospermia (n=23; 36,34  $\pm$  19,36), DAF-2 DA



normozoospermia (n=16;  $89,61 \pm 8,01$ ) e DAF-2 DA não normozoospermia (n=20;  $88,74 \pm 8,03$ ).

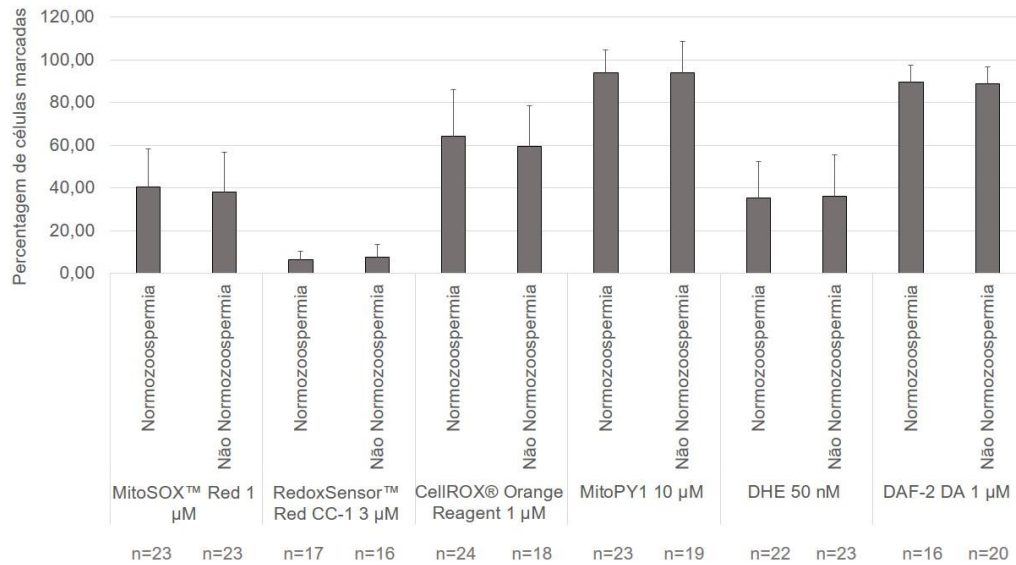


Fig. 51 - Sondas fluorescentes e os parâmetros de qualidade espermática. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com os parâmetros qualidade espermática (concentração, motilidade e morfologia). As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou não normozoospermia - um ou dois parâmetros de qualidade espermática fora dos valores normais. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos e os indivíduos não normozoospermicos relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=23;  $132,79 \pm 84,95$ ), MitoSOX™ Red não normozoospermia (n=23;  $123,01 \pm 58,06$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=17;  $5,46 \pm 1,67$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 não normozoospermia (n=16;  $5,84 \pm 1,74$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=24;  $22,30 \pm 28,34$ ), CellROX® Orange Reagent não normozoospermia (n=18;  $17,70 \pm 5,86$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=23;  $27,82 \pm 12,80$ ), MitoPY1 não normozoospermia (n=19;  $30,72 \pm 11,01$ ), DHE normozoospermia (n=22;  $240,54 \pm 192,03$ ), DHE não normozoospermia (n=23;  $191,77 \pm 116,66$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=16;  $37,65 \pm 15,00$ ) e DAF-2 DA não normozoospermia (n=20;  $35,98 \pm 9,24$ ).



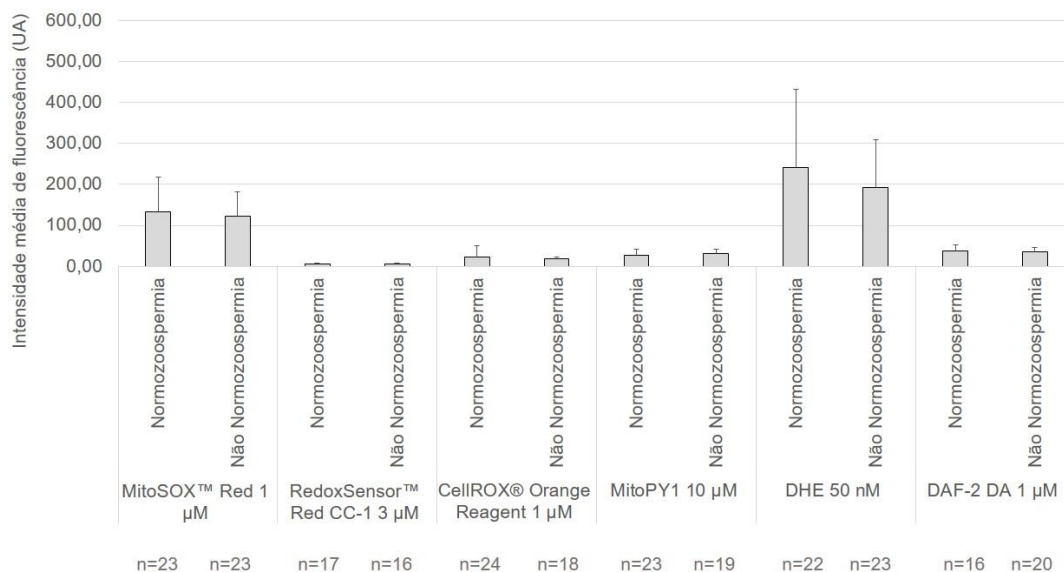


Fig. 52 - Sondas fluorescentes e os parâmetros de qualidade espermática. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com os parâmetros qualidade espermática (concentração, motilidade e morfologia). As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou não normozoospermia - um ou dois parâmetros de qualidade espermática fora dos valores normais. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.5 Concentração de Leucócitos no Ejaculado

As Figuras 53 e 54 referem-se à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência, respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a concentração de leucócitos no ejaculado. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: normozoospermia - quando a concentração de leucócitos é igual ou inferior a um milhão por mL de ejaculado - e leucocitospermia - em que a concentração de leucócitos é superior a um milhão por mL de ejaculado (WHO, 2010; Capítulo 1, secção 1.1).

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a concentração de leucócitos e os indivíduos leucocitospermicos relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=69;  $39,55 \pm 18,43$ ), MitoSOX™ Red leucocitospermia (n=10;  $60,40 \pm 13,93$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=61;  $7,66 \pm 5,06$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 leucocitospermia (n=7;  $9,09 \pm 5,13$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=66;  $60,90 \pm 21,35$ ), CellROX® Orange Reagent leucocitospermia (n=7;  $56,64 \pm 16,88$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=63;  $93,49 \pm 14,52$ ), MitoPY1 leucocitospermia (n=8;  $95,62 \pm 1,55$ ), DHE normozoospermia (n=68;  $37,47 \pm 19,51$ ), DHE leucocitospermia (n=9;  $41,56 \pm 20,55$ ), DAF-2 DA

normozoospermia (n=65;  $88,07 \pm 10,91$ ) e DAF-2 DA leucocitospermia (n=6;  $83,37 \pm 6,94$ ).

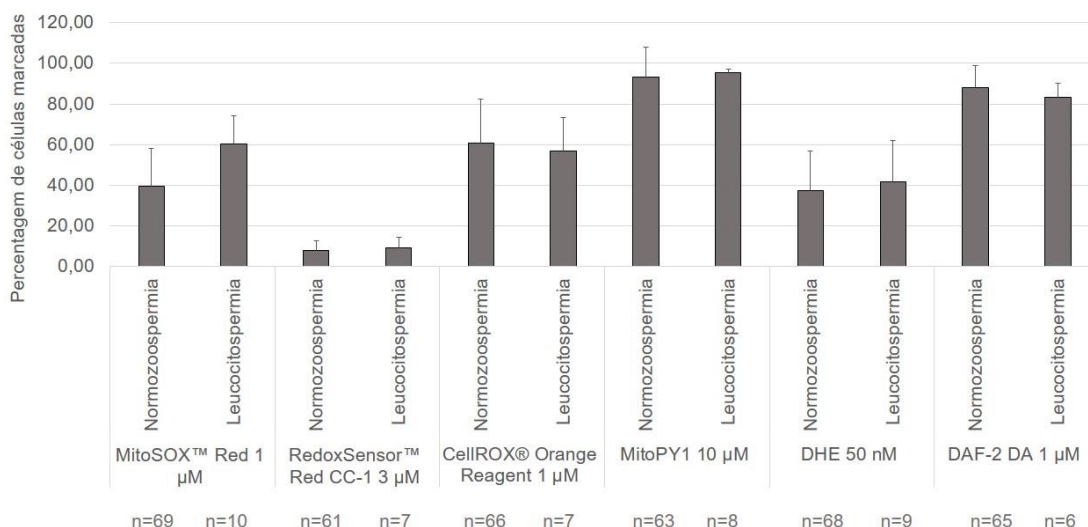


Fig. 53 - Sondas fluorescentes e a concentração de leucócitos no ejaculado. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a concentração de leucócitos no ejaculado. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou leucocitospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos normozoospermicos para a concentração de leucócitos e os indivíduos leucocitospermicos relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red normozoospermia (n=69;  $129,87 \pm 83,44$ ), MitoSOX™ Red leucocitospermia (n=10;  $216,02 \pm 70,47$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 normozoospermia (n=61;  $5,82 \pm 1,43$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 leucocitospermia (n=7;  $6,68 \pm 2,27$ ), CellROX® Orange Reagent normozoospermia (n=66;  $18,71 \pm 17,71$ ), CellROX® Orange Reagent leucocitospermia (n=7;  $16,69 \pm 3,72$ ), MitoPY1 normozoospermia (n=63;  $29,01 \pm 11,25$ ), MitoPY1 leucocitospermia (n=8;  $30,83 \pm 7,22$ ), DHE normozoospermia (n=68;  $199,70 \pm 132,17$ ), DHE leucocitospermia (n=9;  $313,04 \pm 215,11$ ), DAF-2 DA normozoospermia (n=65;  $39,41 \pm 12,20$ ) e DAF-2 DA leucocitospermia (n=6;  $29,25 \pm 5,84$ ).

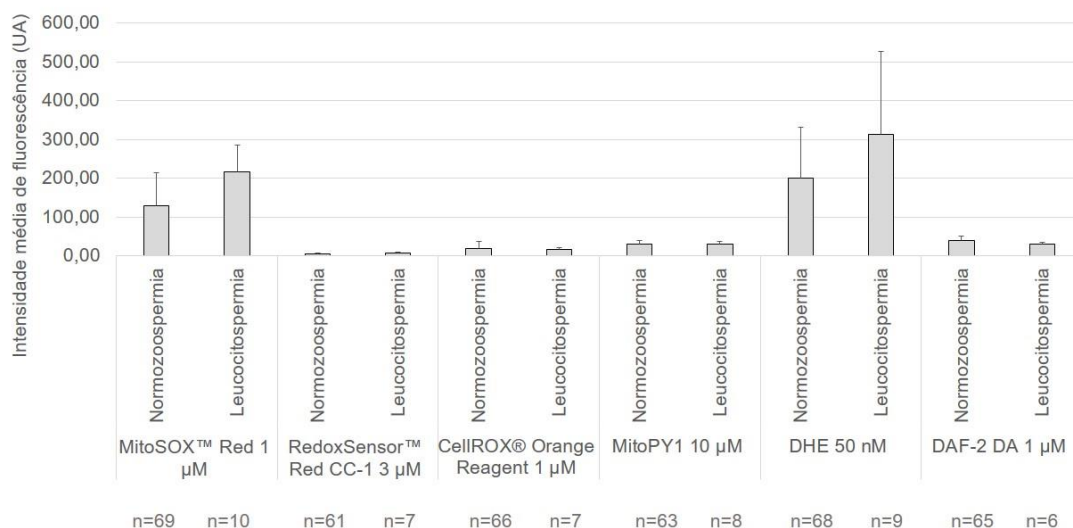


Fig. 54 - Sondas fluorescentes e a concentração de leucócitos no ejaculado. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a concentração de leucócitos no ejaculado. As amostras foram classificadas conforme os indivíduos tivessem normozoospermia ou leucocitospermia. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.1.6 Correlações Entre as Sondas Fluorescentes e Parâmetros de Qualidade Espermática

A Tabela 3 A refere-se às correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, DHE e DAF-2 DA e os parâmetros de qualidade espermática, tais como volume, pH, concentração inicial de espermatozoides, motilidade A+B e motilidade D e anomalias da cauda (Capítulo 2, secção 2.2.2). Não foram obtidas correlações com as sondas CellROX® Orange Reagent e MitoPY1 nem com as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário.

A sonda MitoSOX™ Red correlaciona-se positivamente com a motilidade D ( $r=0,295$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=79$ ) e com as anomalias da cauda ( $r=0,381$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=46$ ), e negativamente com a concentração inicial de espermatozoides ( $r=-0,288$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=79$ ).

A sonda RedoxSensor™ Red CC-1 correlaciona-se negativamente como pH ( $r=-0,340$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=34$ ).

A sonda DHE correlaciona-se positivamente com o volume ( $r=0,273$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=77$ ), com a motilidade D ( $r=0,226$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=77$ ) e com a concentração inicial de espermatozoides ( $r=0,293$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=77$ ).

Por fim, a sonda DAF-2 DA correlaciona-se positivamente com a concentração inicial de espermatozoides ( $r=0,358$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=71$ ) e com a motilidade A+B ( $r=0,234$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=71$ ).

A Tabela 3 B refere-se às correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red e DHE e parâmetros de qualidade espermática, nomeadamente volume, concentração inicial de espermatozoides, motilidade A+B e motilidade D. Não foram obtidas correlações com as sondas RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1 e DAF-2 DA nem com as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário.

A sonda MitoSOX™ Red correlaciona-se positivamente com a motilidade D ( $r=0,295$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=79$ ) e negativamente com a concentração inicial de espermatozoides ( $r= -0,258$ ;  $*p<0,05$ ;  $n=79$ ).

A sonda DHE correlaciona-se positivamente com o volume ( $r=0,347$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=77$ ) e com a motilidade D ( $r=0,416$ ;  $***p<0,001$ ;  $n=77$ ), e negativamente com a concentração inicial de espermatozoides ( $r= -0,354$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=77$ ) e com a motilidade A+B ( $r= -0,362$ ;  $**p<0,01$ ;  $n=77$ ).

Tabela 3 - Correlações entre as sondas fluorescentes e parâmetros de qualidade espermática. Correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, DHE e DAF-2 DA e parâmetros de qualidade espermática (volume, pH, concentração inicial de espermatozoides, motilidade progressiva - rápida e lenta - A+B, motilidade D - imóveis - e anomalias da cauda; **A**). Correlações, estatisticamente significativas, obtidas entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red e DHE e parâmetros de qualidade espermática (volume, concentração inicial de espermatozoides, motilidade A+B e motilidade D) (**B**). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por:  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$ .

<b>A</b>	Volume (mL)	pH	Concentração inicial de espermatozoides ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Motilidade A+B (%)	Motilidade D (%)	Anomalias da Cauda (%)
MitoSOX™ Red 1 $\mu\text{M}$	-	-	$r= -0,288$ $*p<0,05$ $n=79$	-	$r=0,295$ $**p<0,01$ $n=79$	$r=0,381$ $**p<0,01$ $n=46$
RedoxSensor™ Red CC-1 3 $\mu\text{M}$	-	$r= -0,340$ $*p<0,05$ $n=34$	-	-	-	-
DHE 50 nM	$r=0,273$ $*p<0,05$ $n=77$	-	$r=0,293$ $*p<0,05$ $n=77$	-	$r=0,226$ $*p<0,05$ $n=77$	-
DAF-2 DA 1 $\mu\text{M}$	-	-	$r=0,358$ $**p<0,01$ $n=71$	$r=0,234$ $*p<0,05$ $n=71$	-	-

<b>B</b>	Volume (mL)	Concentração inicial de espermatozoides ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	Motilidade A+B (%)	Motilidade D (%)
MitoSOX™ Red 1 $\mu\text{M}$	-	$r= -0,258$ $*p<0,05$ $n=79$	-	$r=0,295$ $**p<0,01$ $n=79$
DHE 50 nM	$r=0,347$ $**p<0,01$ $n=77$	$r= -0,354$ $**p<0,01$ $n=77$	$r= -0,362$ $**p<0,01$ $n=77$	$r=0,416$ $***p<0,001$ $n=77$

### 3.2.2 Resultados das Técnicas de Procriação Medicamente Assistida

#### 3.2.2.1 Gravidez Bioquímica

A gravidez bioquímica é confirmada com a realização do teste imunológico de gravidez, no qual se deteta a gonadotropina coriónica humana, produzida pelo embrião após a nidação (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009; Capítulo 2, secção 2.7).

As Figuras 55 e 56 referem-se à comparação dos resultados (em percentagem de células marcadas e intensidade média de fluorescência, respetivamente) da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a obtenção de gravidez bioquímica através das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), nomeadamente, fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), não tendo sido realizada a distinção entre as duas técnicas. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: negativa - quando não houve obtenção de gravidez, ou seja níveis da hormona gonadotropina coriónica humana abaixo dos valores de referência - e positiva - quando houve obtenção de gravidez, ou seja níveis da hormona gonadotropina coriónica humana acima dos valores de referência.

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos cujas esposas tivessem obtido gravidez bioquímica negativa ou positiva, relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red negativa (n=8; 37,16 ± 17,40), MitoSOX™ Red positiva (n=7; 35,68 ± 10,18), RedoxSensor™ Red CC-1 negativa (n=12; 7,52 ± 4,63), RedoxSensor™ Red CC-1 positiva (n=7; 7,51 ± 5,33), CellROX® Orange Reagent negativa (n=7; 67,08 ± 21,09), CellROX® Orange Reagent positiva (n=5; 52,23 ± 21,14), MitoPY1 negativa (n=9; 96,90 ± 2,61), MitoPY1 positiva (n=4; 97,60 ± 1,29), DHE negativa (n=12; 36,91 ± 11,58), DHE positiva (n=5; 48,69 ± 28,59), DAF-2 DA negativa (n=15; 86,47 ± 9,55) e DAF-2 DA positiva (n=7; 88,31 ± 9,38).

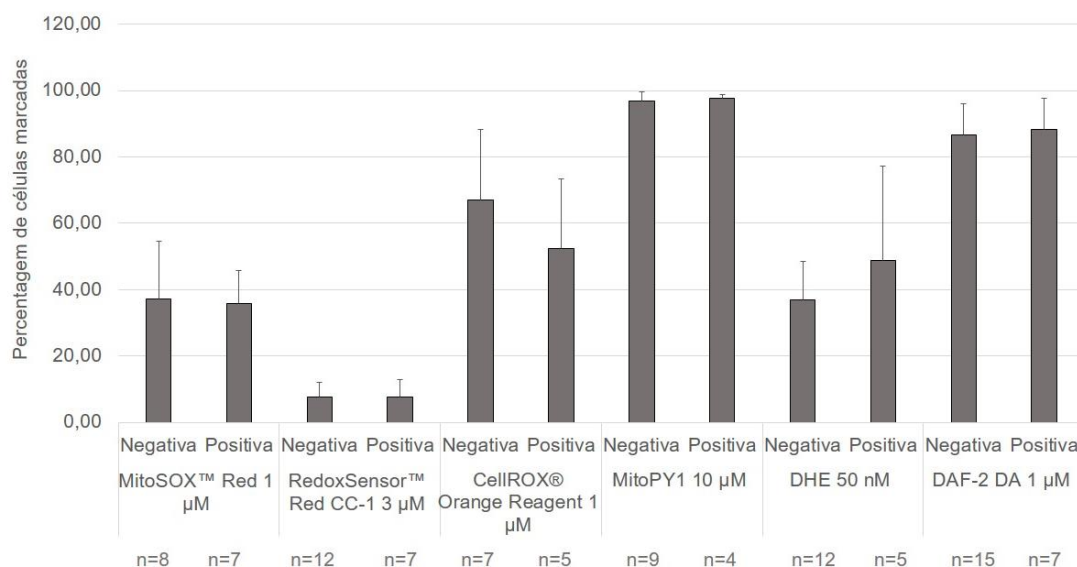


Fig. 55 - Sondas fluorescentes e a obtenção de gravidez bioquímica. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a obtenção de gravidez bioquímica. As amostras foram classificadas conforme as esposas dos indivíduos tivessem gravidez bioquímica negativa ou positiva. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos cujas esposas tivessem obtido gravidez bioquímica negativa ou positiva, relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red negativa (n=8;  $95,82 \pm 40,65$ ), MitoSOX™ Red positiva (n=7;  $111,95 \pm 31,91$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 negativa (n=12;  $5,58 \pm 0,98$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 positiva (n=7;  $5,93 \pm 1,48$ ), CellROX® Orange Reagent negativa (n=7;  $18,94 \pm 7,37$ ), CellROX® Orange Reagent positiva (n=5;  $14,04 \pm 7,06$ ), MitoPY1 negativa (n=9;  $30,98 \pm 8,83$ ), MitoPY1 positiva (n=4;  $23,83 \pm 12,08$ ), DHE negativa (n=12;  $171,61 \pm 94,92$ ), DHE positiva (n=5;  $172,00 \pm 85,61$ ), DAF-2 DA negativa (n=15;  $40,81 \pm 15,00$ ) e DAF-2 DA positiva (n=7;  $38,00 \pm 7,82$ ).

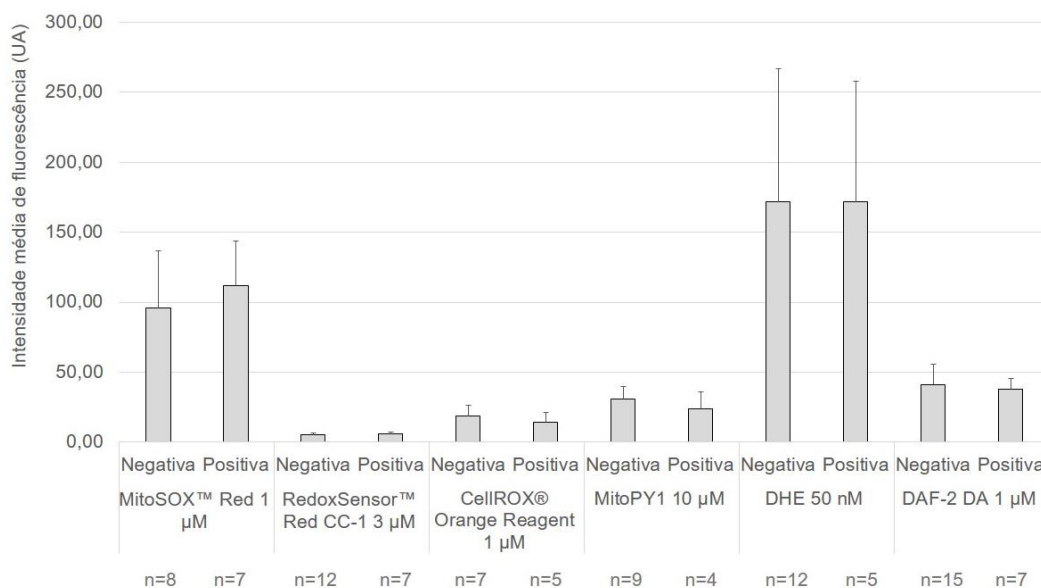


Fig. 56 - Sondas fluorescentes e a obtenção de gravidez bioquímica. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a obtenção de gravidez bioquímica. As amostras foram classificadas conforme as esposas dos indivíduos tivessem gravidez bioquímica negativa ou positiva. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.2.2 Gravidez Clínica

A obtenção de gravidez clínica é confirmada por um médico obstetra através da realização de uma ecografia às 6/7 semanas, havendo a presença de saco gestacional e de embrião (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009; Capítulo 2, secção 2.7).

As Figuras 57 e 58 referem-se à comparação dos resultados, em percentagem de células marcadas, da utilização de todas as sondas - MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA - com a obtenção de gravidez clínica através das técnicas PMA, nomeadamente FIV ou ICSI, não tendo sido realizada a distinção entre as duas técnicas. Para cada sonda, as amostras foram divididas e agrupadas em dois grupos diferentes: negativa - quando não houve obtenção de gravidez clínica, ou seja ausência de saco gestacional e de embrião - e positiva - quando houve obtenção de gravidez clínica, ou seja presença de saco gestacional e de embrião.

Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos cujas esposas tivessem obtido gravidez clínica negativa ou positiva, relativamente à percentagem de células marcadas para cada sonda: MitoSOX™ Red negativa (n=8;  $37,16 \pm 17,40$ ), MitoSOX™ Red positiva (n=7;  $35,68 \pm 10,18$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 negativa (n=13;  $7,26 \pm 4,53$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 positiva (n=6;  $8,07 \pm 5,61$ ), CellROX® Orange Reagent negativa (n=7;  $67,08 \pm 21,09$ ), CellROX® Orange Reagent positiva (n=5;  $52,23 \pm 21,14$ ), MitoPY1 negativa (n=9;  $96,90$

$\pm 2,61$ ), MitoPY1 positiva (n=4;  $97,60 \pm 1,29$ ), DHE negativa (n=12;  $36,91 \pm 11,58$ ), DHE positiva (n=5;  $48,69 \pm 28,59$ ), DAF-2 DA negativa (n=16;  $86,96 \pm 9,43$ ) e DAF-2 DA positiva (n=6;  $87,32 \pm 9,86$ ).

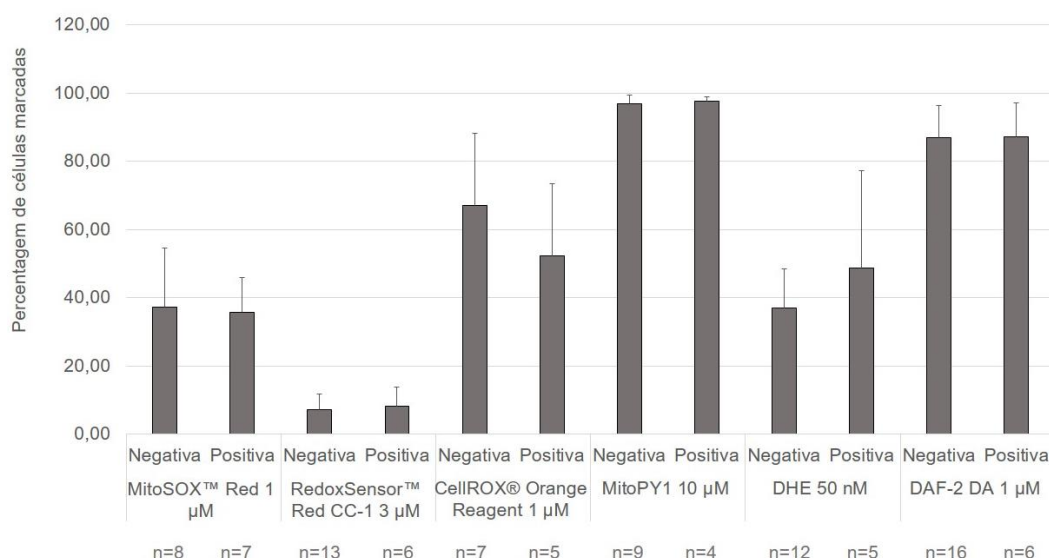


Fig. 57 - Sondas fluorescentes e a confirmação de obtenção de gravidez clínica. Comparação da percentagem de células marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a obtenção de gravidez clínica. As amostras foram classificadas conforme as esposas dos indivíduos obtivessem gravidez clínica negativa ou positiva. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão

Em relação à intensidade média de fluorescência, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos cujas esposas tivessem obtido gravidez clínica negativa ou positiva, relativamente a cada sonda: MitoSOX™ Red negativa (n=8;  $95,82 \pm 40,65$ ), MitoSOX™ Red positiva (n=7;  $111,95 \pm 31,91$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 negativa (n=13;  $5,62 \pm 0,95$ ), RedoxSensor™ Red CC-1 positiva (n=7;  $5,93 \pm 1,48$ ), CellROX® Orange Reagent negativa (n=7;  $18,94 \pm 7,37$ ), CellROX® Orange Reagent positiva (n=5;  $14,04 \pm 7,06$ ), MitoPY1 negativa (n=9;  $30,98 \pm 8,83$ ), MitoPY1 positiva (n=4;  $23,83 \pm 12,08$ ), DHE negativa (n=12;  $171,61 \pm 94,92$ ), DHE positiva (n=5;  $172,00 \pm 85,61$ ), DAF-2 DA negativa (n=16;  $41,69 \pm 14,92$ ) e DAF-2 DA positiva (n=6;  $35,19 \pm 2,59$ ).



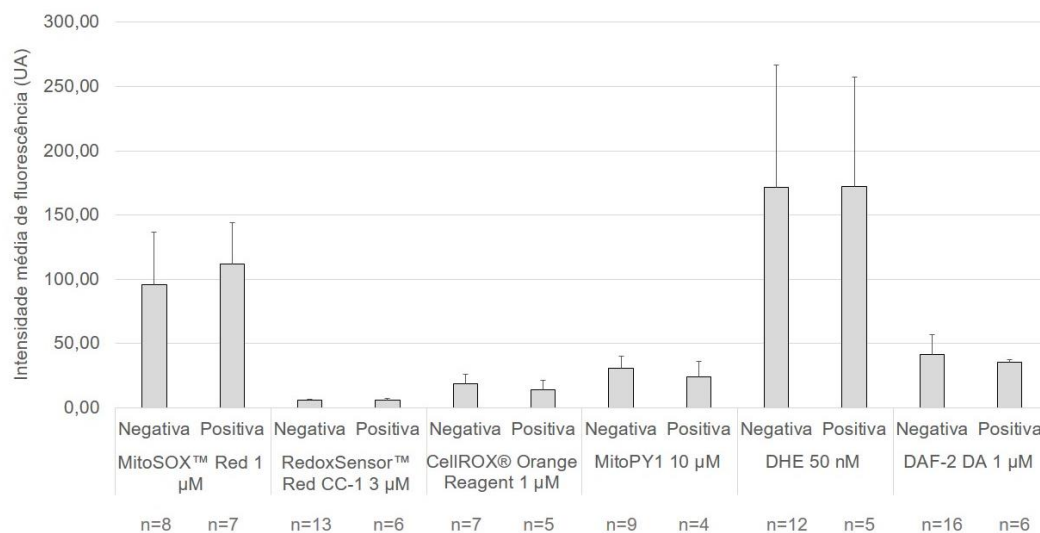


Fig. 58 - Sondas fluorescentes e a confirmação de obtenção de gravidez clínica. Comparação da intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA com a obtenção de gravidez clínica. As amostras foram classificadas conforme as esposas dos indivíduos obtivessem gravidez clínica negativa ou positiva. Não há diferenças estatisticamente significativas. Os resultados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

## **Capítulo 4 - Discussão**

O espermatozoide humano produz espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como o anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), de origem mitocondrial (Agarwal *et al.*, 2014) e citosólica - produzido pela isoforma 5 do sistema nicotinamida-adenina dinucleótido de fosfato reduzida (NADPH) oxidase (NOX5; Musset *et al.*, 2012) - e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produzido pela enzima superóxido dismutase (SOD; Fogg *et al.*, 2011). Além da produção de ROS, o espermatozoide produz também espécies reativas de nitrogénio (RNS), nomeadamente o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) a partir das isoformas da NO sintase (NOS; Buzadzic *et al.*, 2014). Todas estas ROS e RNS podem ainda ser produzidas pelos leucócitos que circulam no líquido seminal (Cassina *et al.*, 2015; Henkel *et al.*, 2005). Uma produção controlada de ROS/RNS é requerida para processos da fisiologia normal do espermatozoide, tais como a capacitação, a reação acrossómica, o movimento hiperativo e a ligação à zona pelúcida (Zini e Al-Hathal, 2011). Contudo, quando a produção de ROS/RNS prevalece sobre a sua neutralização/metabolização, desencadeia-se uma situação de *stress* oxidativo (Bansal e Bilaspuri, 2010), ocorrendo dano no ácido desoxirribonucleico (ADN; Aitken e Koppers, 2011), indução da apoptose (Agarwal *et al.*, 2014), peroxidação lipídica (Henkel, 2011), nitração de tirosinas (Morielli e O'Flaherty, 2015) e alteração do potencial *redox* intracelular, ficando mais oxidativo (Morado *et al.*, 2013). Tais efeitos fazem com que o espermatozoide seja incapaz de fertilizar o óócito (Bansal e Bilaspuri, 2010). De facto, estima-se que cerca de 25% dos homens inférteis possuem elevados níveis de ROS no ejaculado (Zini e Al-Hathal, 2011), estando o *stress* oxidativo relacionado com a infertilidade masculina idiopática (Agarwal *et al.*, 2014).

Posto isto, e tendo em conta que nos últimos anos tem havido um grande interesse em perceber o envolvimento do *stress* oxidativo na infertilidade masculina idiopática (Makker *et al.*, 2009), é essencial otimizar métodos de deteção das ROS/RNS no Sistema Reprodutor Masculino e estudar o efeito das mesmas no contexto da infertilidade. Para tal, recorre-se, comumente, ao uso de sondas fluorescentes que sejam sensíveis às ROS/RNS que se pretende detetar. No presente trabalho, utilizaram-se as seguintes sondas: MitoSOX™ Red que, segundo a literatura, deteta o  $\text{O}_2^-$  de origem mitocondrial, a sonda DHE (dihidroetídio) que deteta o  $\text{O}_2^-$  citosólico, a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 que é indicadora da atividade oxidativa das células, a sonda CellROX® Orange Reagent que deteta ROS, a sonda MitoPY1 que deteta o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na mitocôndria e, por último, a sonda DAF-2 DA (4,5-diamino fluoresceína diacetato) que deteta o  $\text{NO}^\bullet$ .

Tendo em conta toda a informação mencionada, este estudo teve como objetivos principais a caracterização das sondas fluorescentes e a comparação dos resultados da

utilização das mesmas sondas com os dados de qualidade espermática e de resultados das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA).

## 4.1 Caraterização das Sondas Fluorescentes

### 4.1.1 Tampão Fosfato Salino Suplementado vs *Sperm Preparation Medium*

Quando comparada a percentagem de células marcadas, para cada sonda, obtida por microscopia de epifluorescência e por citometria de fluxo, constatou-se que, apesar de se notar uma ligeira deslocação, em relação à origem do *dot plot*, da população de espermatozoides sem marcação, não há grande diferença entre o SPM e o PBS suplementado. De facto, não há interferência, significativa, do vermelho de fenol do SPM na marcação das sondas.

O PBS suplementado, meio de cultura que se utiliza em investigação e que permite a sobrevivência dos espermatozoides tal como foi demonstrado por A. Amaral e colaboradores (2011), pode ser utilizado em estudos de avaliação de ROS/RNS em espermatozoides humanos com sondas fluorescentes. Ainda assim, o SPM - meio comercial amplamente utilizado na área da medicina da reprodução para preparar e manter os espermatozoides - pode, igualmente, ser utilizado em experiências que precisem de ser realizadas num laboratório de PMA, onde poderá não haver PBS, e no meio de cultura rotineiramente usado nas técnicas de PMA.

### 4.1.2 Percentagem de Células Marcadas vs Intensidade Média de Fluorescência

Com o intuito de caracterizar as sondas, procurou-se verificar se, para as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1 e DHE, a percentagem de células marcadas obtida a partir da microscopia de epifluorescência seria igual à percentagem de células marcadas obtida a partir da citometria de fluxo. Em relação à análise dos resultados por citometria de fluxo, procurou-se ainda analisar se a percentagem de células marcadas, com todas as sondas fluorescentes, seria concordante com a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides.

Para a sonda RedoxSensor™ Red CC-1, a percentagem de células marcadas obtida a partir da microscopia de epifluorescência foi sempre muito maior do que a percentagem de células marcadas obtida a partir da citometria de fluxo. De facto, esta última percentagem foi sempre muito baixa, nunca ultrapassando os 20%. Ao validar-se

os resultados de citometria de fluxo pela intensidade média de fluorescência, constatou-se que esta, na maioria das amostras, foi concordante com a percentagem de células marcadas, ou seja, um aumento na percentagem de células marcadas também se traduziu num aumento da intensidade média de fluorescência.

No caso das sondas MitoSOX™ Red e CellROX® Orange Reagent, por vezes a percentagem de células marcadas obtida a partir da microscopia de epifluorescência foi maior do que a percentagem de células marcadas obtida a partir da citometria de fluxo, e por vezes foi menor. Devido a esta inconstância, foi de facto importante validar os resultados de citometria de fluxo igualmente pela intensidade média de fluorescência, tendo-se constatado que esta nem sempre foi concordante com a percentagem de células marcadas.

Em relação às sondas MitoPY1 e DHE, constatou-se que a percentagem de células marcadas obtida a partir da microscopia de epifluorescência foi consideravelmente menor do que a percentagem de células marcadas obtida a partir da citometria de fluxo. No caso da DHE, através da microscopia de epifluorescência, verificou-se que esta sonda confere um fundo avermelhado aos espermatozoides, sendo por vezes difícil distinguir os que tinham marcação dos que não tinham. De facto, presume-se que a elevada percentagem de células marcadas obtida a partir da citometria de fluxo induza o operador em erro, devido a este problema. Ao analisarem-se os resultados pela intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides, verificou-se que o facto da percentagem de células marcadas ser elevada não queria dizer que a população de espermatozoides tivesse uma intensidade média de fluorescência elevada, o que no fundo comprova que para esta sonda não é aconselhado fazer-se a análise dos resultados por percentagem de células marcadas. Para a sonda MitoPY1 verificou-se o mesmo problema, ou seja, através da microscopia de epifluorescência, constatou-se que esta sonda confere um fundo esverdeado aos espermatozoides, sendo difícil distinguir os que tinham marcação dos que não tinham. Além disso, ao analisarem-se os resultados também pela intensidade média de fluorescência verificou-se que quer esta fosse muito elevada ou baixa, a percentagem de células marcadas era sempre elevada. Assim sendo, para as sondas MitoPY1 e DHE não é de todo fiável fazer-se a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo através da percentagem de células marcadas.

No caso da sonda DAF-2 DA, os resultados de citometria de fluxo para esta sonda foram analisados, igualmente, em relação à percentagem de células marcadas e à intensidade média de fluorescência, tendo-se constatado que na maioria das vezes houve concordância entre os resultados.

Uma vez que a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo, relativos à percentagem de células marcadas, está muito dependente do operador - é necessário que este consiga distinguir, o melhor possível, a população sem marcação da marcada, consoante o controlo negativo - considera-se que os resultados apresentados neste trabalho referentes à intensidade média de fluorescência de todas as sondas são mais fiáveis, especialmente para o caso das sondas DHE e MitoPY1. Assim sendo, procurou-se valorizar mais os resultados referentes à intensidade média de fluorescência.

#### 4.1.3 MitoSOX™ Red

No presente trabalho constatou-se que a sonda MitoSOX™ Red apresenta marcação, predominantemente, na cabeça do espermatozoide e em casos raros, na peça intermédia (Figura 12). Esta última marcação vai ao encontro daquilo que é descrito na bula de informação da sonda MitoSOX™ Red. Tendo em conta a composição da sonda (tema abordado no Capítulo 2, secção 2.3.1) e que é na peça intermédia que se localizam as mitocôndrias (Ramalho-Santos *et al.*, 2007), é espectável que a marcação da sonda apareça neste local, o que sugere que esta possa estar a detetar o  $\bullet\text{O}_2^-$  produzido nas mitocôndrias. Esta marcação na peça intermédia foi reportada por Koppers e colaboradores (2008). Outros grupos [Robinson e colaboradores (2006), Mukhopadhyay e colaboradores (2007), Zhou e colaboradores (2011), Adesina e colaboradores (2015) e Boal e colaboradores (2016)] constataram, em diferentes tipos de células, de diferentes espécies, que esta sonda apresenta marcação na mitocôndria. Porém, na grande maioria das amostras visualizadas ao microscópio de epifluorescência, a marcação da sonda apareceu na cabeça do espermatozoide, o que vai contra aquilo que é descrito na bula de informação, contudo Koppers e colaboradores (2008) também reportaram esta marcação. Mukhopadhyay e colaboradores (2007), em células endoteliais mortas ou em apoptose, também constataram que a sonda MitoSOX™ Red apresentava marcação nuclear. Sabendo a composição da sonda (tema abordado no Capítulo 2, secção 2.3.1), pode-se inferir que o 2-hidroxi-etídio formado após a reação do dihidroetídio com o  $\bullet\text{O}_2^-$  na mitocôndria, se desloca para fora de esta, dirigindo-se para o núcleo, localizado na cabeça do espermatozoide (Ramalho-Santos *et al.*, 2007), onde aí irá ligar-se ao ADN e emitir fluorescência. No fundo, o 2-hidroxi-etídio em vez de se ligar ao ADN mitocondrial, liga-se ao ADN nuclear.

Concluiu-se que a sonda MitoSOX™ Red é sensível a  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que com o uso de Antimicina A e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  verificou-se um aumento

estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição MitoSOX™ Red (Figuras 14 B e C e 16 B e C, respetivamente), não havendo qualquer diferença estatisticamente significativa entre os controlos (Figuras 15 B e 17 B). Tais resultados corroboram com a análise dos histogramas da Figura 13, onde se verificou que, com o uso da Antimicina A (Figura 13 C), ocorre um aumento da população que apresenta marcação e que o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13 D) provoca um ligeiro aumento da mesma, relativamente ao histograma da Figura 13 B que corresponde apenas ao uso da sonda. Apesar de a análise dos gráficos das Figuras 14 e 15 levar a crer que a sonda MitoSOX™ Red possa ser sensível ao  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico, pois com o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA há um aumento, estatisticamente significativo, na percentagem de células marcadas (Figura 14 D) e há diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA, havendo uma diminuição da percentagem de células marcadas com o uso deste último controlo (Figura 15 D) - o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como controlo positivo poderá demonstrar que a sonda é sensível ao próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também ao  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico produzido pela NOX5 (tema abordado no Capítulo 1, secção 1.7.1.1.1), enquanto que o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA apenas demonstra que a sonda está a detetar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - o mesmo não se verificou para a intensidade média de fluorescência (Figura 17 D). De facto, não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MitoSOX™ Red e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juntamente com EDTA (Figura 17 D) o que é concordante com o facto dos histogramas D e E da Figura 13 serem semelhantes, logo não se pode concluir que esta sonda seja sensível ao  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico.

Segundo a bula de informação e a literatura seria espectável que a sonda MitoSOX™ Red apresentasse marcação na peça intermédia do espermatozoide caso houvesse a presença de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial. No entanto, no presente trabalho, verificou-se que esta sonda apresenta marcação na cabeça do espermatozoide na presença de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De facto, esta sonda é amplamente utilizada para a deteção de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial em espermatozoides humanos (Koppers *et al.*, 2008; Lachance *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2013) e os resultados obtidos permitem reforçar esta noção. Quanto à deteção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assume-se que o dihidroetídio poderá reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na mitocôndria, originando-se 2-hidroxi-etídio que se irá deslocar para o núcleo, ligando-se ao ADN. Apesar de já ter sido reportado que esta sonda não tem

sensibilidade para  $H_2O_2$  (Purdey *et al.*, 2015), os resultados obtidos contrariam esta hipótese.

#### 4.1.4 DHE

No presente trabalho constatou-se que a sonda DHE apresenta marcação na cabeça do espermatozoide (Figura 18). Tal marcação está de acordo com o que é descrito na literatura em relação a espermatozoides humanos (Boguen *et al.*, 2015; Purdey *et al.*, 2015) e de equinos (Peña *et al.*, 2016), tendo-se constatado que a DHE se liga ao ADN nuclear, e ao que é mencionado na bula de informação da sonda (tema abordado no Capítulo 2, secção 2.3.2)

Concluiu-se que a sonda DHE é sensível a  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e a  $H_2O_2$ , uma vez que com o uso de Antimicina A e de  $H_2O_2$  há um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição DHE (Figuras 20 B e C e 22 B e C, respetivamente). Relativamente aos histogramas da Figura 19, e tendo em conta o que se mencionou sobre esta sonda na secção 4.1.2, assume-se que a primeira população dos histogramas B, C, D e E corresponde à população que não tem marcação. Com o uso de Antimicina A (Figura 19 C), não se verificou nenhuma alteração na localização da segunda população do histograma da Figura 19 B, que corresponde apenas ao uso da sonda, o que não corrobora com a análise dos gráficos das Figuras 20 e 22. Porém, quando se utilizou  $H_2O_2$  (Figura 19 D) verificou-se que a segunda população sofreu um ligeiro deslocamento para uma região de maior intensidade de fluorescência, permanecendo na mesma na região onde há marcação, o que corrobora com a análise dos gráficos das Figuras 20 e 22. Sugere-se ainda que esta sonda não é sensível ao  $\bullet O_2^-$  citosólico, dado que não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com DHE e  $H_2O_2$  com DHE e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 21 D) e o mesmo se verificou para a intensidade média de fluorescência (Figura 23 D), sendo estes resultados concordantes com o facto dos histogramas D e E da Figura 19 serem semelhantes.

Segundo a bula de informação esperava-se que a sonda DHE fosse sensível a  $\bullet O_2^-$  citosólico e não a  $\bullet O_2^-$  mitocondrial, uma vez que esta sonda não tem o catião trifenilfosfónio (TPP). No entanto, no presente trabalho, verificou-se que esta sonda apresenta marcação na cabeça do espermatozoide caso haja a presença de  $H_2O_2$  e de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial. Em relação a  $H_2O_2$ , Purdey e colaboradores (2015) afirmam que a



DHE não é específica para o  $H_2O_2$  nem aconselhada para a deteção desta ROS, porém, mencionam que a DHE poderá reagir com esta ROS. Os resultados apresentados no presente trabalho levam a crer que a DHE é sensível a  $H_2O_2$ . Certos estudos referem o uso de DHE para a deteção de ROS no espermatozoide, não especificando qual a ROS (Aitken *et al.*, 2016; Treulen *et al.*, 2015), outros mencionam que a DHE permite a deteção de  $\bullet O_2^-$  intracelular, não referindo a sua origem (Boguen *et al.*, 2015; Martínez-Pastor *et al.*, 2010). O estudo de Musset e colaboradores (2012) refere a utilização de DHE especificamente para detetar o  $\bullet O_2^-$  citosólico e, por fim, Miriyala e colaboradores (2012) utilizaram esta sonda para detetar a produção de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial em neutrófilos, tendo utilizado Antimicina A como controlo positivo, o que corrobora com os resultados apresentados. Uma explicação possível para esta sonda detetar  $\bullet O_2^-$  mitocondrial, pode-se dever ao facto de esta ROS conseguir sair da mitocôndria através dos canais aniónicos dependentes de voltagem (VDAC) mitocondriais (Fogg *et al.*, 2011; Capítulo 1, secção 1.7.1.1.2).

#### 4.1.5 RedoxSensor™ Red CC-1

No presente trabalho constatou-se que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 apresenta marcação na cabeça e na peça intermédia do espermatozoide (Figura 24). No estudo levado a cabo por Wakefield e colaboradores (2008), realizado em oócitos de ratinho, esta sonda foi utilizada para detetar ROS, tendo-se verificado que apresentava marcação mitocondrial. Verificou-se esta mesma marcação num estudo conduzido em *limb bud cells*, no qual a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 foi utilizada para medir o estado *redox* (Hansen, 2002). O facto de, no presente estudo, se ter constatado que esta sonda apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide - local onde se localizam as mitocôndrias (Ramalho-Santos *et al.*, 2007) - corrobora com os resultados dos estudos mencionados.

Concluiu-se que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 é sensível a  $H_2O_2$ , uma vez que com o uso de  $H_2O_2$  verifica-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição RedoxSensor™ Red CC-1 (Figuras 26 C e 28 C, respetivamente). Tal conclusão é concordante com a análise dos histogramas da Figura 25. De facto, com o uso de  $H_2O_2$  (Figura 25 D) verificou-se que a população se deslocou ligeiramente para a direita, localizando-se tanto na região onde não há marcação, como na região onde há. Além disso, concluiu-se que esta sonda não é sensível a  $\bullet O_2^-$  citosólico, pois não há diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$  com RedoxSensor™ Red CC-1 e  $H_2O_2$

juntamente com EDTA (Figura 27 D), e o mesmo se verificou para a intensidade média de fluorescência (Figura 29 D). O facto de os histogramas D e E da Figura 25 serem ligeiramente diferentes não é concordante com esta última conclusão. Apesar de a análise do gráfico da Figura 26 B levar a crer que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 é sensível ao  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial, dado que com o uso de Antimicina A há um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas, o mesmo não se verificou para a intensidade média de fluorescência (Figura 28 B). Este último resultado é concordante com o facto de não haver diferença entre os histogramas B e C da Figura 25, como tal, conclui-se que esta sonda não é sensível ao  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial.

Na literatura, esta sonda tanto é utilizada para avaliar a atividade oxidativa (Morado *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2012; Tellado *et al.*, 2014) como para detetar ROS (Camello-Almaraz *et al.*, 2006; Haigh e Brown, 2006; Lopes *et al.*, 2010; Wakefield *et al.*, 2008). Em relação ao gâmeta masculino, esta sonda já foi utilizada em espermatozoides de ratinho para determinar o potencial *redox* citosólico (Palmer *et al.*, 2012). No estudo de Hansen (2002), anteriormente mencionado, utilizou-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  como controlo positivo de forma a promover um ambiente intracelular oxidativo, tendo-se constatado que a co-localização da sonda RedoxSensor™ Red CC-1 com as mitocôndrias seria indicativa deste tipo de ambiente. Este último estudo corrobora com os resultados apresentados no presente trabalho, podendo-se inferir que a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 apresenta marcação na peça intermédia - e na cabeça - do espermatozoide caso a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  torne o ambiente intracelular mais oxidativo. Além disso, o presente trabalho sugere que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  altera o estado *redox* da célula.

#### 4.1.6 CellROX® Orange Reagent

No presente trabalho constatou-se que a sonda CellROX® Orange Reagent apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 30). A bula de informação da sonda (tema abordado no Capítulo 2, secção 2.3.4) apenas refere que esta se localiza no citosol, como tal é neste local que se espera ver marcação. Num estudo realizado em células de rato semelhantes a odontoblastos, a marcação de esta sonda foi detetada no citoplasma (Eid *et al.*, 2014). Uma vez que o espermatozoide tem um reduzido volume de citoplasma (Koppers *et al.*, 2008), estando este localizado na peça intermédia (De Jonge e Barrat, 2006), não é de estranhar que, no presente estudo, se tenha verificado que a marcação da sonda surgiu neste local.

Concluiu-se que a sonda CellROX® Orange Reagent é sensível a  $H_2O_2$ , uma vez que com o uso de  $H_2O_2$  verifica-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição CellROX® Orange Reagent (Figuras 32 C e 34 C, respetivamente). Tais resultados são concordantes com a análise dos histogramas da Figura 31, onde se verificou que, em relação ao histograma correspondente apenas à condição CellROX® Orange Reagent (Figura 31 B), o uso de  $H_2O_2$  conduz ao desaparecimento da população sem marcação e ao aumento da população que apresenta marcação (Figura 31 D). Apesar de existir diferença estatisticamente significativa entre intensidade média de fluorescência de populações de espermatozoides marcadas com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  e com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 35 D), esta não tem significado biológico, pois com o uso de  $H_2O_2$  juntamente com EDTA não é suposto a intensidade média de fluorescência aumentar em relação à condição na qual o  $H_2O_2$  foi utilizado - onde se estará a detetar  $H_2O_2$  e  $\bullet O_2^-$  citosólico. Assim, considera-se que a sonda não é sensível a  $\bullet O_2^-$  citosólico, o que é concordante com o facto de não haver diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  e com CellROX® Orange Reagent e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 33 D), bem com o facto dos histogramas D e E da Figura 31 serem semelhantes. Além disso, esta sonda não é sensível a  $\bullet O_2^-$  mitocondrial, pois com o uso de Antimicina A verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência, em relação à condição CellROX® Orange Reagent (Figuras 32 B e 34 B, respetivamente), o que corrobora com a análise dos histogramas da Figura 31, onde se constatou que da Figura 31 B para a Figura 31 C (onde se usou Antimicina A) ocorreu uma notória diminuição da população que apresenta marcação e um aumento da população sem marcação. Este fenómeno poderá depender de uma interação da Antimicina A com a sonda.

Relativamente à sonda CellROX® Orange Reagent, a literatura ainda é escassa. Ainda assim, é referida a utilização desta sonda, em vários tipos de células de diferentes espécies, para deteção de ROS intracelulares (Alvarez-Suarez *et al.*, 2016; Criscuolo *et al.*, 2015; Eid *et al.*, 2014; Fucikova *et al.*, 2014; Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2016). No entanto, há um estudo conduzido em adipócitos derivados de células estaminais humanas, no qual se recorreu ao uso desta sonda, especificamente, para se detetar  $H_2O_2$  (Kang *et al.*, 2013), o que corrobora com os resultados apresentados. Assim, segundo a bula de informação e a literatura, esperava-se que a sonda CellROX® Orange

Reagent fosse sensível não só a  $H_2O_2$ , mas também a  $\bullet O_2^-$  citosólico, dado que a marcação desta sonda aparece no citosol, mas tal não se verificou. Além disso, com a utilização da Antimicina A não se esperava que houvesse uma diminuição da percentagem de células marcadas nem da intensidade média de fluorescência, pois este controlo leva à produção de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial (Koppers *et al.*, 2008), que consequentemente poderá ser convertido a  $H_2O_2$  pela SOD (Fogg *et al.*, 2011). Posto isto, no presente estudo, conclui-se que a sonda CellROX® Orange Reagent apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide caso haja a presença de  $H_2O_2$ . No caso desta sonda, o presente estudo foi especialmente importante para se perceber o comportamento da mesma no espermatozoide humano, dado que até à data não se encontrou informação sobre o uso de CellROX® Orange Reagent no espermatozoide humano nem de outras espécies.

#### 4.1.7 MitoPY1

No presente trabalho constatou-se que a sonda MitoPY1 apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 36), o que corrobora com a bula de informação de esta sonda (tema abordado no Capítulo 2, secção 2.3.5) e com a literatura, na qual se refere que esta sonda apresenta marcação nas mitocôndrias (Dickinson *et al.*, 2013), que no espermatozoide, se localizam na peça intermédia (Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

Concluiu-se que a sonda MitoPY1 é sensível a  $H_2O_2$ , uma vez que com o uso de  $H_2O_2$  verifica-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição MitoPY1 (Figuras 38 C e 40 C, respetivamente). Este resultado é concordante com o facto de se ter verificado que, com o uso de  $H_2O_2$  (Figura 37 D), a população passou a localizar-se somente na região do histograma onde há marcação, estando deslocada para uma região com maior intensidade de fluorescência, relativamente ao histograma da Figura 37 B correspondente apenas ao uso da sonda. Concluiu-se ainda que esta sonda não é sensível ao  $\bullet O_2^-$  citosólico, uma vez que não há diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas com MitoPY1 e  $H_2O_2$  com MitoPY1 e  $H_2O_2$  juntamente com EDTA (Figura 39 D), tendo-se verificado o mesmo para a intensidade média de fluorescência (Figura 41 D), o que corrobora com o facto dos histogramas D e E da Figura 37 serem semelhantes. Além disso, comprova-se que esta sonda não é sensível ao  $\bullet O_2^-$  mitocondrial, pois com a adição de Antimicina A verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da percentagem de células marcadas

(Figura 38 B) e, para a intensidade média de fluorescência, não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre MitoPY1 e MitoPY1 com Antimicina A (Figura 40 B). Estes resultados corroboram, igualmente, com que se verificou na análise da Figura 37, pois do histograma B para o histograma C (Antimicina A), a população deslocou-se para a esquerda, passando a estar localizada tanto na região onde não há marcação, como na onde há.

Tanto em artigos de revisão (Kaludercic *et al.*, 2014; Wages *et al.*, 2016), como em estudos realizados em vários tipos de células de diferentes espécies (Adesina *et al.*, 2015; Boal *et al.*, 2016; Dickinson *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013), incluindo o espermatozoide de ratinho (Gray *et al.*, 2013), a sonda MitoPY1 é utilizada com o intuito de se detetar  $H_2O_2$  na mitocôndria. Apesar existirem poucos estudos com esta sonda, os resultados apresentados neste trabalho vão ao encontro daquilo que é descrito na literatura e na bula de informação, pois conclui-se que a sonda MitoPY1 apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide caso haja a produção de  $H_2O_2$ , que sendo esta uma molécula altamente difundível, facilmente se desloca para a mitocôndria. Ainda assim, esperava-se que, com a utilização da Antimicina A, pudesse haver um aumento da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência, pois este controlo leva à produção de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial (Koppers *et al.*, 2008), que conseqüentemente é convertido a  $H_2O_2$  pela SOD (Fogg *et al.*, 2011).

O presente estudo mostra que a sonda MitoPY1 é indicada para o estudo de  $H_2O_2$  presente na mitocôndria do espermatozoide humano, informação esta que até à data não constava na literatura. A sonda MitoPY1 parece ser uma alternativa viável em relação à sonda diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) - comumente utilizada para medição de  $H_2O_2$  intracelular (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

#### 4.1.8 DAF-2 DA

No presente trabalho constatou-se que a sonda DAF-2 DA apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide (Figura 42), local onde se encontram as isoformas da NOS - neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS; Buzadzic *et al.*, 2014), havendo produção de  $NO^\bullet$  neste local. Esta marcação foi igualmente reportada por Reyes em colaboradores (2004) em espermatozoide de bovino.

Concluiu-se que a sonda DAF-2 DA é sensível a  $NO^\bullet$ , dado que a adição de Espermina provoca um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência em relação à condição DAF-

2 DA (Figuras 44 A e B, respetivamente). Estes resultados corroboram com o que se verificou na análise dos histogramas da Figura 43, pois com o uso de Espermina (Figura 43 C) a população permaneceu na região onde há marcação, no entanto esta deslocou-se para uma região onde a intensidade de fluorescência é maior, em relação ao histograma da Figura 43 B, correspondente apenas ao uso da sonda.

A sonda DAF-2 DA já foi testada em espermatozoides humanos para relacionar a atividade da NOS em espermatozoides imaturos e maduros (Roessner *et al.*, 2010), para avaliar o efeito de ROS nos níveis de NO• (Du Plessis *et al.*, 2010b), o efeito que as técnicas de processamento de espermatozoides têm nos níveis de NO• (Lampiao *et al.*, 2010), o efeito da melatonina nos níveis de NO• (Du Plessis *et al.* 2010a) e o modo como a insulina e a leptina aumentam a produção de esta RNS (Lampiao e Du Plessis, 2008). Quanto à Espermina, já foi utilizada em conjunto com a DAF-2 DA para aumentar os níveis de NO• em diversos estudos realizados em vários tipos de células de diferentes espécies (Champlin e Truman, 2000; Dedkova *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2003), ou sem a DAF-2 DA, como é o caso do estudo de Zini e colaboradores (1995), em que se pretendeu estudar o envolvimento do NO• na capacitação de espermatozoides humanos. Os resultados do presente estudo corroboram com a literatura, concluindo-se que esta sonda apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide caso haja a presença de NO•.

#### 4.1.9 Correlações Entre as Sondas Fluorescentes

De acordo com a Tabela 2 existe uma forte correlação positiva entre a percentagem de células marcadas (Tabela 2 A) e a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada (Tabela 2 B) com MitoSOX™ Red e com DHE. Tais resultados corroboram, em parte, com o estudo levado a cabo por Aitken e colaboradores (2013) onde se concluiu que existia uma forte correlação entre estas duas sondas quando se pretendeu detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial. De facto, estas sondas são semelhantes em termos de composição, tal como já foi mencionado - ambas são formadas por dihidroetídio, que ao reagir com as ROS dá origem a 2-hidroxi-etídio, sendo que este composto se intercala com o ADN nuclear e emite fluorescência vermelha (Koppers *et al.*, 2008) - e, como se constatou no presente trabalho, ambas apresentam marcação na cabeça do espermatozoide e são sensíveis a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial. No estudo de Koppers e colaboradores (2008), assumiu-se que a DHE detetava ROS no geral e que a sonda MitoSOX™ Red era específica para ROS de origem mitocondrial, tendo-se constatado que havia uma correlação positiva entre as duas sondas.

Os resultados referentes aos gráficos das Figuras 45 e 46 e à Tabela 3 (secção 4.2.1) reforçam a correlação positiva existente entre as sondas MitoSOX™ Red e DHE. De facto, estas duas sondas têm um comportamento similar, o que é expectável uma vez que são quimicamente idênticas fora o catião TPP para localização mitocondrial.

Na Tabela 2 B verifica-se que há uma correlação positiva entre a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada com MitoSOX™ Red e com MitoPY1. Ambas as sondas têm na sua constituição o catião TPP (Aitken *et al.*, 2013; Dickinson *et al.*, 2013), que permite que estas sondas se desloquem para a mitocôndria, onde irão reagir com as ROS presentes nesse organelo, nomeadamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao qual se verificou, no presente trabalho, que ambas são sensíveis. Até à data não foram encontrados estudos onde se correlacionasse estas duas sondas. No entanto, existem estudos realizados em vários tipos de células, que não o espermatozoide, que referem a utilização de MitoSOX™ Red para detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e MitoPY1 para detetar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na mitocôndria (Adesina *et al.*, 2015; Boal *et al.*, 2016; Dickinson *et al.*, 2013; Kaludercic *et al.*, 2014), porém estas sondas não foram correlacionadas.

Dado que a sonda MitoSOX™ Red se correlaciona positivamente com a sonda DHE e que ambas têm um comportamento muito semelhante, esperava-se que também houvesse uma correlação positiva, ainda que menos forte, entre DHE e MitoPY1, uma vez que, apesar de a DHE não ter o catião TPP, as sondas MitoPY1 e DHE são sensíveis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, tal correlação não se verificou. Até à data não foram encontrados estudos nos quais estas duas sondas fossem correlacionadas. Existem artigos de revisão sobre a deteção de ROS/RNS em sistemas biológicos (Wages *et al.*, 2016; Woolley *et al.*, 2013) que mencionam o uso de MitoPY1 para a deteção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de DHE para tradicional deteção de ROS, sendo que esta última sonda não é apontada como uma possível escolha para a deteção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Verificou-se também que a sonda MitoSOX™ Red se correlaciona positivamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1. O facto de ambas serem sensíveis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se verificou neste trabalho, poderá explicar esta correlação. A utilização de ambas as sondas é referida num estudo realizado em células neuronais de ratinho (Haigh *et al.*, 2015) e noutro em células tumorais (Sharma *et al.*, 2012), sendo que em ambos se recorreu ao uso da sonda RedoxSensor™ Red CC-1 para avaliar o potencial *redox* e a MitoSOX™ Red para detetar  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial, não se tendo correlacionado as duas sondas. Porém, no estudo levado a cabo por Palmer e colaboradores (2012), realizado em espermatozoides de ratinho, no qual se pretendeu avaliar o efeito da dieta e do exercício no *stress* oxidativo, ambas as sondas foram utilizadas com a mesma finalidade

que nos outros dois estudos, contudo, verificou-se que a percentagem de células marcadas com MitoSOX™ Red correlacionava-se positivamente com RedoxSensor™ Red CC-1.

Uma vez que se constatou haver uma grande semelhança entre as sondas DHE e MitoSOX™ Red seria de esperar que a DHE também se correlacionasse positivamente com a sonda RedoxSensor™ Red CC-1, pois, no presente trabalho provou-se que ambas são sensíveis a  $H_2O_2$ . Porém, tal correlação não se verificou. As sondas RedoxSensor™ Red CC-1 e DHE já foram utilizadas para avaliar a produção de ROS em vários tipos de células de ratinho (Camello-Almaraz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013), sendo que no estudo levado a cabo por Domínguez-Luis e colaboradores (2013), estas duas sondas foram utilizadas para detetar a produção intracelular de ROS, em neutrófilos humanos induzida por anti-inflamatórios não esteroides, tendo-se verificado resultados semelhantes para as duas sondas, no entanto estas não foram correlacionadas. Assim, futuramente seria interessante aumentar-se o número de amostras deste estudo a fim de perceber se de facto existe alguma correlação positiva entre estas sondas.

Verificou-se também que existe uma correlação negativa entre a percentagem de células marcadas (Tabela 2 A) e a intensidade média de fluorescência da população de espermatozoides marcada (Tabela 2 B) com as sondas DAF-2 DA e MitoSOX™ Red. Apesar de as sondas serem sensíveis a compostos diferentes, a correlação negativa obtida sugere que poderá haver uma acção oposta entre o  $NO^\bullet$  e as ROS, nomeadamente  $^\bullet O_2^-$  mitocondrial e  $H_2O_2$ . Sabe-se que níveis elevados de  $NO^\bullet$  podem levar à inibição da respiração nas mitocôndrias do espermatozoide e, consequentemente, a um aumento das ROS (Buzadzic *et al.*, 2014). No estudo levado a cabo por Fan e colaboradores (2011), em células HeLa, a sonda DAF-2 DA foi utilizada para a medição de RNS intracelulares, incluindo  $NO^\bullet$ , e a sonda MitoSOX™ Red foi utilizada para a deteção de mitocôndrias que estivessem a produzir ROS. Apesar de as sondas não terem sido correlacionadas, verificou-se que, ao inibir-se a NOS, os níveis de RNS e de ROS diminuíram e que, ao utilizarem-se antioxidantes enzimáticos para as ROS, os níveis de RNS também diminuíram. Assim, tendo em conta a literatura, no presente estudo seria de esperar que houvesse uma correlação positiva entre as sondas, o que não se verificou. Ainda assim, e tendo em conta que se obteve uma correlação negativa entre DAF-2 DA e MitoSOX™ Red, esperava-se que as sondas DHE, MitoPY1 e CellROX® Orange Reagent também se correlacionassem negativamente com a DAF-2 DA, dado que estas sondas são sensíveis a ROS. Dado o conflito existente entre o presente trabalho e a literatura, futuramente, seria interessante



apurar melhor esta questão e verificar se de facto existe uma correlação negativa entre o NO• e as ROS.

Em relação às sondas CellROX® Orange Reagent e MitoPY1, esperava-se que houvesse uma correlação positiva entre as duas sondas, relativamente à intensidade média de fluorescência, uma vez que se constatou que ambas apresentam marcação na peça intermédia e que são sensíveis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contudo, tal correlação não se verificou. Na literatura não foram encontrados estudos em que fossem usadas as duas sondas, sendo a informação sobre estas ainda escassa. Como tal, futuramente seria importante aumentar-se o número de amostras deste estudo a fim de perceber se de facto existe alguma correlação positiva entre estas sondas.

## 4.2 Sondas Fluorescentes, Dados de Qualidade Espermática e Resultados de Técnicas de PMA

Na segunda parte do presente trabalho utilizaram-se amostras provenientes de indivíduos que se deslocaram ao Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para realizar espermograma ou com indicação para a realização de técnicas de PMA (Capítulo 2, secção 2.2), consequentemente utilizaram-se amostras de indivíduos férteis e sub-férteis, não se tendo feito distinção.

### 4.2.1 Concentração Inicial de Espermatozoides

A concentração espermática é dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade de uma dada amostra de ejaculado (Kao *et al.*, 2008), sendo que o *stress* oxidativo e a produção de ROS estão associados a alterações neste parâmetro (Agarwal *et al.*, 2014).

No presente estudo verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células (Figura 45) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 46) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre indivíduos normozoospermicos para a concentração e oligozoospermicos. Ainda assim, para as sondas MitoSOX™ Red, CellROX® Orange Reagent e DHE poderá haver diferença estatisticamente significativa caso se aumente o número de amostras com oligozoospermia, sendo que para as sondas MitoSOX™ Red e DHE o valor das médias da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência seria maior nas amostras com oligozoospermia e para o caso da sonda CellROX® Orange Reagent parece verificar-se o oposto. Apesar de não haver

diferenças estatisticamente significativas nos gráficos das Figuras 45 e 46, é de notar que os resultados de ambos os gráficos para estas sondas (MitoSOX™ Red, CellROX® Orange Reagent e DHE) são concordantes.

O facto de a média da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência poder ser maior nas amostras com oligozoospermia, para as sondas MitoSOX™ Red e DHE, é reforçado pela análise da Tabela 3. De facto, verifica-se que tanto a percentagem de células (Tabela 3 A), como a intensidade média de fluorescência das populações de espermatozoides (Tabela 3 B) marcadas com MitoSOX™ Red se correlacionam negativamente com a concentração inicial de espermatozoides no ejaculado. Em relação à sonda DHE, procurou-se valorizar mais os resultados referentes à intensidade média de fluorescência, verificando-se que, de acordo com a Tabela 3 B, esta sonda se correlaciona negativamente com a concentração inicial de espermatozoides no ejaculado. Apesar de estas correlações serem fracas, levam a crer, juntamente com a análise dos gráficos das Figuras 45 e 46, que nas amostras oligozoospermicas poderá haver uma maior concentração de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De facto já se provou que indivíduos que tenham uma concentração de espermatozoides normal apresentam níveis de ROS mais baixos do que aqueles que têm este parâmetro alterado (Agarwal *et al.*, 1994; Agarwal *et al.*, 2006). Porém, nestes estudos não se especificou que ROS é que surgem em níveis superiores em amostras oligozoospermicas, podendo com o presente estudo supor-se que tais ROS poderão ser o  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Quanto ao facto de se poder vir a verificar que para a sonda CellROX® Orange Reagent a média da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência seja maior nas amostras normozoospermicas para a concentração, poderia levar a crer que estas produzissem mais  $\text{H}_2\text{O}_2$  que as oligozoospermicas, o que é contraditório face ao que se concluiu no parágrafo anterior. Como não foi encontrada nenhuma correlação entre a utilização desta sonda e a concentração espermática, a suposição de que as amostras normozoospermicas para a concentração também produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$  é posta em causa.

Relativamente ao  $\text{NO}^\bullet$ , até à data, não foram encontrados estudos que associassem esta RNS à concentração espermática e o presente estudo foi inconclusivo.

#### 4.2.2 Motilidade dos Espermatozoides

A motilidade é dos parâmetros mais importantes para avaliar a qualidade dos espermatozoides (Du Plessis *et al.*, 2010b). Vários estudos realizados ao longo dos

últimos anos referem que existe uma relação entre as ROS e a motilidade do espermatozoide, sendo que quanto maior for o nível de ROS, pior é a motilidade (Agarwal *et al.*, 1994; Agarwal *et al.*, 2006; Eskenazi *et al.*, 2003; Hammadeh *et al.*, 2006; Iwasaki e Gagnon, 1992; Lenzi *et al.*, 1993; Saleh *et al.*, 2002).

No presente estudo verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células (Figura 47) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 48) de populações de espermatozoides, marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre indivíduos normozoospermicos para a motilidade progressiva - rápida e lenta (A+B) e astenozoospermicos. No entanto, em relação à intensidade média de fluorescência (Figura 48) prevê-se que para as sondas DHE e DAF-2 DA possa vir a haver diferença estatisticamente significativa caso se aumente o número de amostras com astenozoospermia. Para a sonda DHE, o valor da média da intensidade média de fluorescência poderá ser maior nas amostras com astenozoospermia e em relação à DAF-2 DA este poderá ser maior nas amostras normozoospermicas.

Para sonda DHE, o facto de a média da intensidade média de fluorescência poder ser maior nas amostras com astenozoospermia é coerente com os dados da Tabela 3 B, pois verifica-se que a intensidade média de fluorescência de populações de espermatozoides marcadas com DHE se correlaciona negativamente com a motilidade A+B e positivamente com a motilidade D. Curiosamente, para a percentagem de células marcadas (Tabela 3 A) também se verifica que existe uma correlação positiva entre a motilidade D e a sonda DHE. Além disso, na Tabela 3 destaca-se também a correlação positiva existente entre a sonda MitoSOX™ Red e a motilidade D. Mais uma vez, as sondas MitoSOX™ Red e DHE apresentam um comportamento semelhante. Assim, pode-se inferir que em amostras astenozoospermicas, nas quais a percentagem de espermatozoides com motilidade A+B é baixa e com motilidade D é elevada, poderá haver uma maior concentração de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Das ROS existentes no espermatozoide, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é apontado como o principal responsável pela perda de motilidade (Agarwal *et al.*, 2014; Armstrong *et al.*, 1999; Du Plessis *et al.*, 2010b; Hammadeh *et al.*, 2006), o que vai de encontro com os resultados apresentados neste estudo. De facto, pensa-se que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  prejudica a motilidade espermática na medida em que este, ao iniciar a peroxidação lipídica, conduz à perda de trifosfato de adenosina (ATP; Hammadeh *et al.*, 2006), ocorrendo a diminuição da fosforilação das proteínas do axonema, conduzindo-se à imobilização dos espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2014). Além desta ROS, o presente estudo propõe que

o  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial possa também ter um papel negativo no que toca à motilidade dos espermatozoides.

Relativamente ao efeito do  $\text{NO}^\bullet$  na motilidade, segundo a literatura, certos estudos, nos quais se mediu o nível intracelular (Du Plessis *et al.*, 2010b) ou o nível seminal (Balercia *et al.*, 2004; Nobunaga *et al.*, 1996) de  $\text{NO}^\bullet$ , afirmam que esta RNS inibe a motilidade. Noutros estudos chegou-se à mesma conclusão, porém utilizaram-se compostos que libertavam  $\text{NO}^\bullet$  (Joo *et al.*, 1999; Rosselli *et al.*, 1995; Weinberg *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2004). Contrariamente, outros trabalhos defendem que esta RNS é importante para a motilidade (Hellstrom *et al.*, 1994; Zhang e Zheng, 1996). No presente estudo não se verificou diferença estatisticamente significativa entre as amostras normozoospermicas para a motilidade progressiva (A+B) relativamente às astenozoospermicas, embora as normozoospermicas aparentam ter níveis ligeiramente superiores desta RNS. Atualmente aceita-se que o  $\text{NO}^\bullet$  tem um efeito duplo na motilidade: a concentrações baixas promove-a, pois, ao conduzir à produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), ocorre a activação de cinases dependentes de cGMP (via clássica, tema abordado no Capítulo 1, secção 1.7.1.1.4; Buzadzic *et al.*, 2014), e a concentrações elevadas leva à redução desta (Doshi *et al.*, 2012).

#### 4.2.3 Morfologia dos Espermatozoides

De acordo com a literatura, a morfologia, além da motilidade, é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a qualidade dos espermatozoides (Du Plessis *et al.*, 2010b). Sabe-se que as ROS estão negativamente correlacionadas com a morfologia dos espermatozoides (Agarwal *et al.*, 1994; Agarwal *et al.*, 2006) e que se suspeita que espermatozoides com morfologia anormal sejam, além dos leucócitos, os principais produtores de ROS no ejaculado (Iwasaki e Gagnon, 1992).

No presente estudo verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células (Figura 49) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 50) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre indivíduos normozoospermicos para a morfologia e teratozoospermicos.

Relativamente às correlações, não se verifica a existência de correlações (relativas às sondas e à morfologia) concordantes entre as Tabelas 3 A e B.

Recentemente, no estudo realizado por Ghani e colaboradores (2013), verificou-se que nas amostras teratozoospermicas existe uma maior produção de ROS do que nas normozoospermicas, sendo que estes propuseram uma associação entre as

amostras teratozoospermicas, a expressão de NOX5 e a produção de ROS. Tal associação poderá ser consequência da presença de um excesso de citoplasma nos espermatozoides com morfologia anormal (tema abordado no Capítulo 1, secção 1.7.1.1.3; Ghani *et al.*, 2013). Uma vez que a NOX5 é a responsável pela produção de  $\bullet\text{O}_2^-$  citosólico (Musset *et al.*, 2012) e que, no presente trabalho se esperava que a sonda CellROX® Orange Reagent fosse sensível a esta ROS (secção 4.1.6), seria igualmente de esperar que, para esta sonda, houvesse diferença estatisticamente significativa entre amostras normozoospermicas e teratozoospermicas, e que a média da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência (Figuras 49 e 50, respetivamente) fosse maior nas amostras com teratozoospermia. Porém tal não se verificou, nem mesmo qualquer correlação entre esta sonda e a morfologia (Tabela 3).

Na literatura consta que o NO• contribui para a morfologia normal dos espermatozoides (Revelli *et al.*, 2001), todavia, em concentrações elevadas induz alterações na morfologia (Wu *et al.*, 2004). Porém, em relação a esta RNS, o presente trabalho foi inconclusivo.

#### 4.2.4 Normozoospermia vs Não Normozoospermia

A análise de parâmetros qualidade espermática, tais como concentração, motilidade e morfologia, ajuda a prever se o indivíduo em causa terá espermatozoides viáveis que permitam a reprodução (Kao *et al.*, 2008). É sabido que as ROS se relacionam com alterações nestes três parâmetros (Agarwal *et al.*, 1994; Hammadeh *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2014) e que amostras “não normozoospermicas” têm níveis de ROS mais elevados do que as normozoospermicas (Li *et al.*, 2012).

No entanto, no presente estudo não se verificou que existissem diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células (Figura 51) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 52) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre indivíduos normozoospermicos para a concentração, motilidade e morfologia e não normozoospermicos - com um ou dois destes parâmetros qualidade espermática alterados.

Estes resultados são coerentes com o facto de não se terem encontrado diferenças estatisticamente significativas nos gráficos referentes aos parâmetros anteriores (secções 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3). Contudo, como já foi referido (secções 4.2.1 e 4.2.2), para as sondas MitoSOX™ Red e DHE foram encontradas correlações entre a concentração inicial de espermatozoides e a motilidade (Tabela 3), sugerindo-se que

amostras que possuam níveis elevados de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  possam ter um destes parâmetros alterado ou mesmo os dois.

Relativamente ao  $\text{NO}\bullet$ , na literatura presume-se que níveis elevados desta RNS estejam associados à infertilidade masculina, sendo que os parâmetros mais afetados são a motilidade e a morfologia (Buzadzic *et al.*, 2014). Contudo, do presente estudo não se podem tirar relações estatisticamente significativas, apesar de se inferir que o  $\text{NO}\bullet$  poderá ser importante na motilidade progressiva.

#### 4.2.5 Concentração de Leucócitos no Ejaculado

Os leucócitos presentes no ejaculado são considerados como a principal fonte de ROS (Agarwal *et al.* 2014; Henkel *et al.*, 2005). Segundo a literatura, certos grupos relatam que existe uma associação entre a presença de leucócitos no ejaculado e a infertilidade (Armstrong *et al.*, 1999; Athayde *et al.*, 2007; Ferramosca *et al.*, 2013; Henkel *et al.*, 2005; Henkel, 2011; Saleh *et al.*, 2002; Sharma e Agarwal, 1996), enquanto que outros não encontraram qualquer correlação entre leucocitospermia e infertilidade (Aitken *et al.*, 1994; Aitken e Baker, 1995; Tomlinson *et al.*, 1993).

No presente estudo verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células (Figura 53) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 54) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre indivíduos normozoospermicos para a concentração de leucócitos e leucocitospermicos. É importante recordar que na preparação das amostras utilizadas no presente trabalho foi realizada a centrifugação por gradiente de densidade, sendo este um método que possibilita a remoção dos leucócitos em excesso (Chen e Bongso, 1999), porém os espermatozoides estiveram previamente em contacto com os leucócitos, possibilitando a entrada de ROS provenientes dos mesmos nos espermatozoides. Ainda assim, prevê-se que para as sondas MitoSOX™ Red e DAF-2 DA possa vir a haver diferença estatisticamente significativa caso se aumente o número de amostras com leucocitospermia, sendo que para a sonda MitoSOX™ Red o valor da média da percentagem de células marcadas e da intensidade média de fluorescência poderá ser maior nas amostras com leucocitospermia e para o caso da sonda DAF-2 DA parece verificar-se o oposto. Além disso, para a sonda MitoPY1 prevê-se também que possa vir a haver diferença estatisticamente significativa, sendo que, para esta sonda, o valor da média da percentagem de células marcadas seria maior nas amostras com leucocitospermia. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas nos gráficos das Figuras 53 e 54, é de notar que os resultados de ambos os gráficos,

para as sondas onde se julga que poderão vir a surgir diferenças estatisticamente significativas (MitoSOX™ Red e DAF-2DA), são concordantes, não se tendo verificado o mesmo para a sonda MitoPY1. Assim, supõe-se que as amostras, com mais do que um milhão de leucócitos por mL de ejaculado, possam ter níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  superiores às que são normozoospermicas. Por outro lado, as amostras normozoospermicas aparentam ter níveis de  $\text{NO}\bullet$  superiores às que são leucocitospermicas.

Os resultados do presente trabalho, ainda que sem significância estatística, levam a crer que (i) os leucócitos produzem ROS, tais como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que, sendo neutro, facilmente entra no espermatozoide, tal como foi sugerido por Armstrong e colaboradores (1999) e por Henkel e colaboradores (2005) e/ou que (ii) a presença de leucócitos no ejaculado pode estimular a produção de ROS, nomeadamente  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pelo espermatozoide. De facto, no estudo realizado por Saleh e colaboradores (2002) provou-se que existe uma relação entre a presença de leucócitos e a produção de ROS por parte do espermatozoide. Contudo, no trabalho conduzido por Marques e colaboradores (2014) verificou-se que a presença de leucócitos não influencia a produção, no espermatozoide, de ROS de origem mitocondrial.

Segundo a literatura, amostras de indivíduos sub-fértéis com leucocitospermia apresentam níveis de  $\text{NO}\bullet$  superiores comparativamente a amostras de indivíduos sub-fértéis sem leucocitospermia (Nobunaga *et al.*, 1996), o que parece indicar que a leucocitospermia é uma das causas da elevação dos níveis de  $\text{NO}\bullet$  no espermatozoide. Todavia, o presente trabalho propõe, tal como descrito anteriormente, que as amostras normozoospermicas poderão apresentar níveis de  $\text{NO}\bullet$  superiores às que são leucocitospermicas, o que leva a crer que os leucócitos não são a principal fonte de  $\text{NO}\bullet$ . Ainda assim é importante ressaltar que no presente estudo as amostras não foram agrupadas consoante os indivíduos fossem férteis ou sub-fértéis.

#### 4.2.6 Resultados das Técnicas de PMA

No contexto das técnicas de PMA, é sabido que um excesso de ROS - produzidas pelo gâmeta masculino ou existentes no ejaculado - tem um impacto negativo na fertilidade (Agarwal *et al.*, 2014).

Contrariamente ao encontrado no presente estudo, em que relativamente às taxas de desenvolvimento embrionário e de fecundação não foram encontradas correlações com as sondas fluorescentes, no estudo realizado por Zorn e colaboradores (2003) verificou-se a existência de uma correlação negativa entre os níveis de ROS no ejaculado e o desenvolvimento embrionário de embriões obtidos após a realização de

ICSI. Nesse mesmo estudo verificou-se ainda que elevados níveis de ROS no ejaculado estão associados com uma perda de capacidade de fertilização por parte dos espermatozoides e que tal poderá ser consequência da peroxidação lipídica e/ou da fragmentação do ADN induzida pelas ROS (temas abordados no Capítulo 1, secção 1.7.1.3.2). Noutro estudo, constatou-se a existência de uma correlação negativa entre os níveis de ROS e a taxa de fecundação aquando a realização de FIV (Agarwal *et al.*, 2005). De facto, defende-se que a medição dos níveis de ROS no ejaculado, antes de se proceder a qualquer técnica de PMA, poderá ajudar a prever se as técnicas terão sucesso ou não (Agarwal *et al.*, 2005; Zorn *et al.*, 2003). Em relação ao NO•, no estudo realizado, em embriões de ratinho, por Joo e colaboradores (1999) concluiu-se que concentrações elevadas de compostos libertadores de NO• inibem o desenvolvimento embrionário.

Em relação à gravidez bioquímica, não há diferença estatisticamente significativa, na percentagem de células marcadas (Figura 55) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 56) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas MitoSOX™ Red, RedoxSensor™ Red CC-1, CellROX® Orange Reagent, MitoPY1, DHE e DAF-2 DA, entre amostras de indivíduos cujas esposas realizaram um teste de gravidez bioquímica negativa ou positiva. Todavia, no trabalho realizado por Marques e colaboradores (2014) constatou-se que existe uma associação entre amostras de espermatozoides com baixos níveis de ROS mitocondriais e a obtenção de gravidez bioquímica após FIV ou ICSI, o que leva a crer que, de facto, níveis baixos de ROS são importantes para a funcionalidade do espermatozoide (tema abordado no Capítulo 1, secção 1.7.1.3.1). Relativamente ao NO•, até à data, não foram encontrados estudos que associassem esta RNS com a obtenção de gravidez bioquímica.

No que se refere à gravidez clínica, não há diferença estatisticamente significativa, na percentagem de células marcadas (Figura 57) nem na intensidade média de fluorescência (Figura 58) de populações de espermatozoides marcadas com as sondas mencionadas, entre amostras de indivíduos cujas esposas obtiveram confirmação de gravidez clínica negativa ou positiva. No estudo levado a cabo por Hammadeh e colaboradores (2006) também não foi encontrada qualquer relação entre os níveis de ROS no ejaculado e a obtenção de gravidez por ICSI nem por FIV. Porém, Zorn e colaboradores (2003) verificaram a existência de uma correlação negativa entre os níveis de ROS no ejaculado e a taxa de gravidez por embrião transferido, sendo que o dano no ADN do espermatozoide poderá ser uma das causas desta correlação negativa. Relativamente ao NO•, até à data, não foram encontrados estudos que associassem esta RNS com a confirmação de gravidez clínica.



## **Capítulo 5 - Conclusão e Perspetivas Futuras**

No presente estudo, concluiu-se que as sondas MitoSOX™ Red, CellROX® Orange Reagent, DHE e MitoPY1 são indicadas para a deteção de espécies reativas de oxigénio (ROS), a sonda DAF-2 DA é indicada para a deteção de espécies reativas de nitrogénio (RNS) e a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 permite a deteção da alteração do estado *redox* promovida pelo  $H_2O_2$  no gâmeta masculino, tanto num contexto de investigação como de PMA, sendo que as sondas devem ser, preferencialmente, adicionadas às suspensões celulares em tampão fosfato salino (PBS) suplementado e os resultados obtidos por citometria de fluxo devem ser analisados tendo em conta a intensidade média de fluorescência, para que estes sejam o mais fidedignos possível.

Mais concretamente, na primeira parte deste estudo concluiu-se que (i) as sondas MitoSOX™ Red e DHE, na presença de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e de anião superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) mitocondrial, apresentam marcação na cabeça do espermatozoide, (ii) a sonda RedoxSensor™ Red CC-1 apresenta marcação na peça intermédia e na cabeça do espermatozoide caso haja a presença de  $H_2O_2$ , (iii) a sonda CellROX® Orange Reagent apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide caso haja a presença de  $H_2O_2$ , (iv) a sonda MitoPY1, na presença de  $H_2O_2$  na mitocôndria, apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide e (v) a sonda DAF-2 DA apresenta marcação na peça intermédia do espermatozoide caso haja a presença de óxido nítrico ( $NO\bullet$ ). No futuro, seria interessante testar os controlos positivos utilizados com as sondas que detetam ROS - Antimicina A,  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$  mais ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) - na sonda DAF-2 DA, e testar-se a Espermina nas sondas que detetam ROS.

Não foi possível provar que as sondas indicadas para a deteção de ROS - especialmente as sondas DHE e CellROX® Orange Reagent - fossem sensíveis a  $\bullet O_2^-$  citosólico. Futuramente, poder-se-ia aumentar o número de amostras incubadas com estas duas sondas e os controlos positivos: Antimicina A,  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$  mais EDTA.

Constatou-se que algumas sondas se correlacionam entre si. De facto, verificou-se que existe uma forte correlação positiva entre as sondas MitoSOX™ Red e DHE, e que a primeira se correlaciona positivamente com as sondas MitoPY1 e RedoxSensor™ Red CC-1 e negativamente com a sonda DAF-2 DA.

Em relação à segunda parte do presente estudo, pode-se inferir que em amostras de indivíduos com oligozoospermia poderá haver uma maior concentração de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e de  $H_2O_2$  e o mesmo se constatou para amostras astenozoospermicas. Porém, em relação a amostras de indivíduos com teratozoospermia, este estudo provou-se inconclusivo. Concluiu-se assim, amostras que possuam níveis elevados de  $\bullet O_2^-$  mitocondrial e de  $H_2O_2$  têm, provavelmente, um

dos parâmetros de qualidade espermática - a concentração e a motilidade dos espermatozoides - alterado ou mesmo os dois. Futuramente, de forma a tirar relações mais fidedignas, seria importante aumentar-se o número de amostras com oligozoospermia e com astenozoospermia e repetir-se a parte do estudo relativa à morfologia espermática.

Relativamente à presença de leucócitos no ejaculado este estudo prevê, sem significância estatística, que amostras que tenham mais do que um milhão de leucócitos por mL de ejaculado possam ter níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  superiores às que são normozoospermicas, e estas, por sua vez poderão ter níveis de  $\text{NO}\bullet$  superiores às que são leucocitospérmicas. Além disso, estes resultados levam a crer que (i) os leucócitos produzem ROS, nomeadamente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que, sendo neutro, facilmente entra no espermatozoide e/ou que (ii) os leucócitos presentes no ejaculado podem estimular a produção de ROS -  $\bullet\text{O}_2^-$  mitocondrial e  $\text{H}_2\text{O}_2$  - pelo espermatozoide, e ainda que (iii) os leucócitos, provavelmente, não são a principal fonte de  $\text{NO}\bullet$ . Todavia, seria importante estudar-se melhor o papel dos leucócitos na infertilidade masculina e tentar perceber se de facto os leucócitos promovem a produção, por parte do espermatozoide, de ROS ou de RNS.

No presente trabalho não foram encontradas quaisquer correlações entre as ROS/RNS e os resultados das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA), que poderá dever-se ao baixo número de amostras. Como tal, é importante que no futuro se trabalhe no sentido de se obter um maior número de amostras para se correlacionar com as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário e para se comparar a obtenção de gravidez - fazendo-se a distinção entre as técnicas de PMA: FIV e ICSI, pois há diferenças no modo como ocorre a fecundação em cada técnica - com a presença de ROS/RNS no espermatozoide.

A realização deste estudo foi essencial para caracterizar sondas fluorescentes, especialmente porque algumas nunca tinham sido estudadas em espermatozoides humanos e outras nem em espermatozoides de outras espécies, e para compreender a utilidade que estas podem ter no contexto da infertilidade masculina. No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer, nomeadamente no que diz respeito a compreender melhor o papel do  $\text{NO}\bullet$  no contexto da (in)fertilidade masculina. Além disso, futuramente, seria importante verificar se as ROS e o  $\text{NO}\bullet$  podem ser utilizados como biomarcadores para selecionar espermatozoides de melhor qualidade.

## **Capítulo 6 - Referências Bibliográficas**

- Abou-haila, A. e Tulsiani, D.R.P. (2009) Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485(1), pp.72–81.
- Adesina, S.E., Kang, B.Y., Bijli, K.M., Ma, J., Cheng, J., Murphy, T., Hart, C.M. e Sutliff, R.L. (2015) Targeting mitochondrial reactive oxygen species to modulate hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Free Radical Biology & Medicine*, 87, pp.36–47.
- Agarwal, A., Ikemoto, I. e Loughlin, K.R., (1994) Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *The Journal of Urology*, 152, pp.107–110.
- Agarwal, A., Saleh, R.A. e Bedaiwy, M.A. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4), pp.829–843.
- Agarwal, A., Allamaneni, S.S.R., Nallella, K.P., George, A.T. e Mascha, E. (2005) Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: A qualified meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 84(1), pp.228–231.
- Agarwal, A., Sharma, K.R., Nallella, K.P., Thomas, A.J., Alvarez, J.G. e Pikka, S.C. (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 86(4), pp.878–885.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. e du Plessis, S.S. (2014) Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), pp.1–17.
- Aitken, R.J. e Roman, S.D. (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1(1), pp.15–24.
- Aitken, R.J. e Koppers, A.J. (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian journal of andrology*, 13(1), pp.36–42.
- Aitken, R.J., Smith, T.B., Lord, T., Kuczera, L., Koppers, A.J., Naumovski, N., Connaughton, H., Baker, M.A. e De Iuliis, G.N. (2013) On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology*, 1(2), pp.192–205.
- Aitken, R.J., Flanagan, H.M., Connaughton, H., Whiting, S., Hedges, A. e Baker, M.A. (2016) Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function. *Andrology*, 4(2), pp.345–360.

- Alvarez-Suarez, J.M., Francesca, G., Cordero, M., Gasparini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Mazzoni, L., Afrin, S., Beltrán-Ayala, P., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Varela-Lopez, A., Quiles, J.L. e Battino, M. (2016) Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. *Journal of Functional Foods*, 25, pp.38–49.
- Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, A.P. e Ramalho-Santos, J. (2011) Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 96(4), pp.848-850.
- Amaral, A. Lourenço, B., Marques, M. e Ramalho-Santos, J. (2013) Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(5), pp.163–74.
- Amaral, S., Redmann, K., Sanchez, V., Mallidis, C., Ramalho-Santos, J. e Schlatt, S. (2013a) UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. *Andrology*, 1(5), pp.707–714.
- Amaral, S., Amaral, A. e Ramalho-Santos, J. (2013b) Aging and male reproductive function: A mitochondrial perspective. *Frontiers in Bioscience*, 5 (November 2015), pp.181–197.
- Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J. e Sikka, S. C. (1999) Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), pp.869–880.
- Athayde, K.S., Cocuzza, M., Agarwal, A., Krajcir, N., Lucon, A.M., Srougi, M. e Hallak, J.(2007) Development of Normal Reference Values for Seminal Reactive Oxygen Species and Their Correlation With Leukocytes and Semen Parameters in a Fertile Population. *Journal of Andrology*, 28(4), pp.613–620.
- Baker, M.A. & Aitken, R.J. (2004) The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1), pp.47–54.
- Baker, M.A. e Aitken, R.J. (2005) Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive biology and endocrinology*, 3, pp.67.
- Balercia, G., Mosca, F., Mantero, F., Boscaro, M., Mancini, A., Ricciardo-Lamonica, G. e Littarru, G. (2004) Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with

- idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and Sterility*, 81(1), pp. 93-8.
- Bansal, A.K. e Bilaspuri, G.S. (2010) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 2011, pp.686-137.
- Bayir, H., e Kagan, V. E. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Critical care (London, England)*, 12(1), pp. 206.
- Boal, F., Timotin, A., Roumegoux, J., Alfarano, C., Calise, D., Anesia, R., Parini, A., Valet, P., Tronchere, H. e Kunduzova, O. (2016) Apelin-13 administration protects against ischaemia/reperfusion-mediated apoptosis through the FoxO1 pathway in high-fat diet-induced obesity. *British Journal of Pharmacology*, pp.1850–1863.
- Boguen, R., Treulen, F., Uribe, P. e Villegas, J.V. (2015) Ability of *Escherichia coli* to produce hemolysis leads to a greater pathogenic effect on human sperm. *Fertility and Sterility*, 103(5), pp.1155–1161.
- Buffone, M.G., Ijiri, T.W., Cao, W., Merdushev, T., Aghajanian, H.K. e Gerton, G.L. (2013) Heads or Tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular Reproduction*, 79(1), pp.4–18.
- Buzadzic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Korac, A., Korac, B. e Otasevic, V. (2014) New insights into male (in)fertility: the importance of NO. *British Journal of Pharmacology*, pp.1–13.
- Camello-Almaraz, Pozo, M.J., Murphy, M.P. e Camello, P.J. (2006) Mitochondrial production of oxidants is necessary for physiological calcium oscillations. *Journal of Cellular Physiology*, 206(2), pp.487–494.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Minorsky, P.V., Wasserman, S.A., Jackson, R.B. (2008). *Biology*, 8<sup>th</sup> Edition. Pearson.
- Cassina, A. Silveira, P., Cantu, L., Montes, J.M. e Radi, R. (2015) Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production. *Biology of Reproduction*, 93(5), pp.1–10.
- Champlin, D.T. e Truman, J.W. (2000) Ecdysteroid coordinates optic lobe neurogenesis via a nitric oxide signaling pathway. *Development (Cambridge, England)*, 127, pp.3543–3551.

- Chang, Raymond (2005). Química. 8.<sup>a</sup> Edição. McGraw-Hill
- Chen, M.J. e Bongso, A. (1999) Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction* ;14(3), pp.759-64
- Criscuolo, C., Procaccini, C., Meschini, M.C., Cianflone, A., Carbone, R., Doccini, S., Devos, D., Nesti, C., Vuillaume, I., Pellegrino, M., Filla, A., De Michele, G., Matarese, G. e Santorelli, F. M. (2015) Powerhouse failure and oxidative damage in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Journal of Neurology*, 262(12), pp.2755–2763.
- Dedkova, E.N., Ji, X., Lipsius, S.L. e Blatter, L. (2004) Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 286(2), pp.C406–C415.
- De Jonge C. e Barrat C. (2006). The sperm cell. Cambridge University Press.
- Dickinson, B.C., Lin, V.S. e Chang, C.J. (2013) Preparation and use of MitoPY1 for imaging hydrogen peroxide in mitochondria of live cells. *Nature Protocols*, 8(6), pp.1249–1259.
- Domínguez-Luis, M., Herrera-García, A., Arce-Franco, M., Armas-González, E., Rodríguez-Pardo, M., Lorenzo-Díaz, F., Fera, M., Cadenas, S., Sánchez-Madrid, F. e Díaz-González, F. (2013) Superoxide anion mediates the L-selectin down-regulation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 85, pp.245-256.
- Doshi, S.B., Khullar, K., Sharma, R.K. e Agarwal, A. (2012) Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 10, pp.109.
- Du Plessis, S.S., Hagenaar, K. e Lampiao, F. (2010a) The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia*, 42(2), pp.112–6.
- Du Plessis, S.S., Mcallister, D.A., Luu, A., Savia, J., Agarwal, A. e Lampiao, F. (2010b) Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia*, 42(3), pp.206–210.
- Du Plessis, S.S., Agarwal, A., Mohanty, G. e Linde, M. (2015) Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology*, 17(2)



pp. 230-235

- Eid, A.A., Primus, C.M., Hammond, B.D., Susin, L.F., Pashley, D.H. e Tay, F.R. (2014) In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *Journal of Endodontics*, 40(2), pp.255–260.
- Eskenazi, B., Wyrobek, A.J., Slotter, E., Kidd, S.A., Moore, L., Young, S. e Moore, D. (2003) The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2), pp. 447-54.
- Esteves, S.C., Miyaoka, R. e Agarwal, A. (2011) An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(4), pp.691–700.
- Fan, S., Li, L., Chen, S., Yu, Y., Qi, M., Tashiro, S.-I., Onodera, S. e Ikejima, T. (2011) Silibinin induced-autophagic and apoptotic death is associated with an increase in reactive oxygen and nitrogen species in HeLa cells. *Free Radical Research*, 45(11–12), pp. 1307–1324.
- Ferramosca, A., Pinto Provenzano, S., Montagna, D.D., Coppola, L. e Zara, V. (2013) Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology*, 82(1), pp.78–83.
- Florman, H.M., Jungnickel, M.K. e Sutton, K.A. (2008) Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), pp.503–510.
- Fogg, V.C., Lanning, N.J. e Mackeigan, J.P. (2011) Key Aspects of Mitochondrial Biology Altered glucose metabolism in cancer cells : the Warburg effect Cancer's Sweet Tooth : Alterations in Glucose Metabolism Overview of normal glucose metabolism. *Chinese Journal of Cancer*, 30(8), pp. 526-539.
- Ford, W.C.L. (2004) Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 10(5), pp.387–399.
- Fox, S.I. (2011). *Human Physiology*, 12<sup>th</sup> Edition. Mcgraw-Hill
- Fucikova, J. et al., Moserova, I., Truxova, I., Hermanova, I., Vancurova, I., Partlova, S., Fialova, A., Sojka, L., Cartron, P.F., Houska, M., Rob, L., Bartunkova, J. e Spisek, R. (2014) High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International Journal of Cancer*, 135(5), pp.1165–1177.
- Ghani, E., Keshtgar, S., Habibagahi, M., Ghannadi, A. e Kazeroni, M. (2013) Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. *Andrologia*, 45(5), pp.351–356.

- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Alvarez, J.G., Thomas, A.J. e Agarwal, A. (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*, 16(9), pp.1922–1930.
- Gonzalez-Sanchez, E., Perez, M.J., Nytofte, N.S., Briz, O., Monte, M.J., Lozano, E., Serrano, M.A. e Marin, J.J.G. (2016) Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, pp.466–477.
- Gray, J.E., Starmer, J., Lin, V.S., Dickinson, B.C. e Magnuson, T. (2013) Mitochondrial hydrogen peroxide and defective cholesterol efflux prevent in vitro fertilization by cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of reproduction*, 89(1), p.17.
- Guo, H., Aleyasin, H., Howard, S.S., Dickinson, B.C., Lin, V.S., Haskew-Layton, R.E., Xu, C., Chen, Y. e Ratan, R.R. (2013) Two-photon fluorescence imaging of intracellular hydrogen peroxide with chemoselective fluorescent probes. *Journal of Biomedical Optics*, 18(10), pp.106002–106002.
- Gupta, S.K. e Bhandari, B., (2011) Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology*, 13(1), pp.97–105.
- Haigh, C.L. e Brown, D.R. (2006) Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), pp.677–689.
- Haigh, C.L., McGlade, A.R. e Collins, S.J. (2015) MEK1 transduces the prion protein N2 fragment antioxidant effects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(8), pp.1613–1629.
- Hammadeh, M.E., Radwan, M., Al-Hasani, S., Micu, R., Rosenbaum, P., Lorenz, M. e Schmidt, W. (2006) Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reproductive biomedicine online*, 13(5), pp.696–706.
- Hansen, J.M. (2002) Thalidomide Modulates Nuclear Redox Status and Preferentially Depletes Glutathione in Rabbit Limb versus Rat Limb. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(3), pp.768–776.
- Hellstrom, W.J., Bell, M., Wang, R. e Sikka, S.C. (1994). Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertility and Sterility*, 61, pp.1117–1122.

- Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H.R., Schill, W. B. e Kruger, T.F. (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, 83(3), pp.635–642.
- Henkel, R.R. (2011) Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), pp.43–52.
- Herrero, M.B. e Gagnon, C. (2001) Nitric Oxide : A Novel Mediator of Sperm Function. *Journal of Andrology*, 22(3), pp.349–356.
- Herrero, M.B., de Lamirande, E. e Gagnon, C. (2001) Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Molecular human reproduction*, 7(10), pp.913–921.
- Holstein, A.F., Schulze, W. e Davidoff, M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 1, pp.107.
- Iwasaki, A. e Gagnon, C. (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57, pp.409–417.
- Jedrzejowska, R.W., Wolski, J.K. e Hilczer, J.S. (2012) The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 66(1), pp.60–67.
- Joo, B.S. , Park, S.H., Park, S.J., Kang, H.S., Moon, H.S., Kim, H.D., (1999) The effect of nitric oxide on sperm cell function and embryo development. *American journal of reproductive immunology*, 42(6), pp.327–34.
- Kaludercic, N., Deshwal, S. e Di Lisa, F. (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Frontiers in Physiology*, 5, pp.1–15.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennerly, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J. e Ischiropoulos, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), pp.1–6.
- Kang, T., Lu, W., Xu, W., Anderson, L., Bacanamwo, M., Thompson, W., Chen, Y.E. e Liu, D. (2013) MicroRNA-27 (miR-27) targets prohibitin and impairs adipocyte differentiation and mitochondrial function in human adipose-derived stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), pp.34394–34402.
- Kao, S.H., Chao, H.T., Chen, H.W., Hwang, T.I., Liao, T.L. e Wei, Y.H. (2008) Increase

- of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*, 89, pp.1183-90.
- Kobayashi, H., Nagao, K. e Nakajima, K. (2012) Focus issue on male infertility. *Advances in Urology*, 2012, pp.1-6.
- Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A. e Aitken, R.J. (2008) Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), pp.3199–3207.
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A. e du Plessis, S.S. (2010) Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(5), pp.425–435.
- Lachance, C., Goupil, S., Tremblay, R. R. e Leclerc, P. (2016) The immobilization of human spermatozoa by STAT3 inhibitory compound V results from an excessive intracellular amount of reactive oxygen species. *Andrology*, 4(1), pp.133–142.
- Lamirande, E. de e Gagnon, C. (1995) Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(1), pp.15–21.
- Lamirande, E. De, Leclerc, P. e Gagnon, C. (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3(3), pp.175–194.
- Lampiao, F. e Du Plessis, S.S. (2008) Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian Journal of Andrology*, 10(5), pp.799–807.
- Lampiao, F., Strijdom, H. e Plessis, S.S. (2010) Effects of Sperm Processing Techniques Involving Centrifugation on Nitric Oxide, Reactive Oxygen Species Generation and Sperm Function. *The Open Andrology Journal*, 2, pp.1–5.
- Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., Lombardo, F. e Dondero, F. (1993) Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Human Reproduction*, 8(10), pp. 1657-62.
- Lewis, S.E.M., Donnelly, E.T., Sterling, E.S.L., Kennedy, M.S., Thompson, W. e Chakravarthy, U. (1996) Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility.

*Molecular Human Reproduction*, 2(11), pp.873–878.

- Li, Z., Zhou, Y., Liu, R., Lin, H., Liu, W., Xiao, W. e Lin, Q. (2012) Effects of semen processing on the generation of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential of human spermatozoa. *Andrologia*, 44(3), pp.157–163.
- Lie, R.T., Lyngstadaas, A., Orstavik, K.H., Bakketeig, L.S., Jacobsen, G. e Tanbo, T. (2005) Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 34(3), pp.696–701.
- Liu, S., McConnell, S.C. e Ryan, T.M. (2013) Erythropoiesis in the absence of adult hemoglobin. *Molecular and cellular biology*, 33(11), pp.2241–51.
- Lopes, A.S., Lane, M. e Thompson, J.G. (2010) Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human Reproduction*, 25(11), pp.2762–2773.
- Makker, K., Agarwal, A. e Sharma, R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *The Indian journal of medical research*, 129(4), pp.357–367.
- Marques, M., Sousa, A.P., Paiva, A., Almeida-Santos, T. e Ramalho-Santos, J. (2014) Low amounts of mitochondrial reactive oxygen species define human sperm quality. *Reproduction*, 147(6), pp.817–824.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L. e de Paz, P. (2010) Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2), pp.67–78.
- Miriyala, S., Spasojevicb, I., Tovmasyanc, A., Salveminid, D., Vujaskovicc, Z., St. Clair, D. e Batinic-Haberlec, I. (2012) Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), pp. 794–814
- Morado, S., Cetica, P., Beconi, M., Thompson, J. G. e Dalvit, G. (2013) Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. *Reproduction*, 145(5), pp.471–478.
- Morielli, T. e O’Flaherty, C. (2015) Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149(1), pp.113–123.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B.J, Madesh, M. e Pacher, P. (2007) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide

- production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*, 2(9), pp.2295–301.
- Musset, B., Clark, R.A., DeCoursey, T.E., Petheo, G.L., Geiszt, M., Chen, Y., Cornell, J.E., Eddy, C.A., Brzyski, R.G. e El Jamali, A. (2012) NOX5 in Human Spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), pp.9376–9388.
- Nelson, D. L., Lehninger, A.L., Cox, M. M. (2008). *Lehninger's Principles of Biochemistry*. W. H. 5<sup>th</sup> Edition. Freeman and Company.
- Nobunaga, T., Tokugawa, Y., Hashimoto, K., Kubota, Y., Sawai, K., Kimura, T., Shimoya, K., Takemura, M., Matsuzaki, N., Azuma, C. e Saji, F. (1996) Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility. *American journal of reproductive immunology*, 36, pp.193–197.
- Ortiz, P., Stoos, B.A., Hong, N.J. Boesch, D.M., Plato, C.F. e Garvin, J.L. (2003) High-salt diet increases sensitivity to NO and eNOS expression but not NO production in THALs. *Hypertension*, 41(3 II), pp.682–687.
- Palmer, N.O., Bakos, H.W., Owens, J., Setchell, B.P. e Lane, M. (2012) Diet and exercise in an obese mouse fed a high fat diet improves metabolic health and reverses perturbed sperm function. *American journal of physiology, Endocrinology and metabolism*, 302(7), pp.768–780.
- Peña, F.J., Ortega Ferrusola, C. e Martín Muñoz, P. (2016) New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*, 86(1), pp.366–372.
- Purdey, M.S., Connaughton, H.S., Whiting, S., Schartner, E.P., Monro, T.M., Thompson, J.G., Aitken, R.J. e Abell, A.D. (2015) Boronate probes for the detection of hydrogen peroxide release from human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 81, pp.69–76.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P.C., Sousa, A.P. e Amaral, A. (2009) Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*, 15(5), pp.553–572.
- Ramalho-Santos, J., Amaral, A., Sousa, A.P., Rodrigues, A.S., Martins, L., Baptista, M., Mota, P.C., Tavares, R., Amaral, S. e Gamboa, S. (2007) Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 351(239), pp.394–402.
- Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Ochetti, S., Bosia, A., Massobrio, M.,

- Lindblom, B. e Ghigo, D. (2001) Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64(6), pp. 1708-12
- Reyes, R., Vázquez, M. L. S. e Delgado, N. M. (2004) Detection and bioimaging of nitric oxide in bovine oocytes and sperm cells. *Archives of Andrology*, 50, pp.303–309.
- Robinson, K.M., Janes, M.S., Pehar, M., Monette, J.S., Ross, M.F., Hagen, T.M., Murphy, M.P. e Beckman, J.S. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), pp. 15038–15043.
- Roessner, C., Paasch, U., Glander, H.J. e Grunewald, S. (2010) Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia*, 42(2), pp.132–137.
- Rosselli, M., Dubey, R.K., Imthurn, B., Macas, E. e Keller, P.J. (1995). Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reproduction*, 10, pp.1786–1790.
- Saleh, R., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Nada, E.A., Evenson, D.P. e Alvarez, J.G. (2002) Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 78(6), pp.1215–1224.
- Sanocka, D. e Kurpisz, M., (2004) Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*, 2(12), pp.1-7.
- Sharma, P.K. e Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Journal of Urology*, 48, pp.835–850.
- Sharma, P.K., Dwarakanath, B.S. e Varshney, R. (2012) Radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose and 6-aminonicotinamide involves activation of redox sensitive ASK1-JNK/p38MAPK signaling in head and neck cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), pp.1500–1513.
- Signorelli, J., Diaz, E.S. e Morales, P. (2012) Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and Tissue Research*, 349(3), pp.765–782.
- Sikka, S.C., Rajasekaran, M. e Hellstrom, W.J., (1995) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of andrology*, 16(6), pp.464–468.
- Sousa, A.P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrín, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T. e Ramalho-Santos, J. (2011)

Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS one*, 6(3), pp.18112.

- Sousa, M.I., Amaral, S., Tavares, R.S., Paiva, C. e Ramalho-Santos, J. (2013) Concentration-dependent Sildenafil citrate (Viagra) effects on ROS production, energy status, and human sperm function. *Systems biology in reproductive medicine*, 6368, pp.1–8.
- Tellado, M.N., Alvarez, G.M., Dalvit, G.C. e Cetica, P.D. (2014) The Conditions of Ovary Storage Affect the Quality of Porcine Oocytes. *Advances in Reproductive Sciences*, 2, pp.57–67.
- Tomlinson, M.J., Barrat, C.L.R. e Cooke, I.D. (1993) Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, 60, 69–1075.
- Treulen, F., Uribe, P., Boguen, R. e Villegas, J.V. (2015) Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction*, 30(4), pp.767–776.
- Tvrda, E., Kňazická, Z., Bárdos, L., Massányi, P. e Lukáč, N. (2011) Impact of oxidative stress on male fertility - a review. *Acta veterinaria Hungarica*, 59(4), pp.465–84.
- Wages, P.A., Cheng, W.Y., Gibbs-Flournoy, E. e Samet, J.M. (2016) Live-cell imaging approaches for the investigation of xenobiotic-induced oxidant stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1-14
- Wakefield, S.L., Lane, M., Schulz, S.J., Hebart, M.L., Thompson, J.G. e Mitchell, M. (2008) Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 294(2), pp.425–434.
- Weinberg, J.B., Doty, E., Bonaventura, J. e Haney, A.F. (1995) Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertility Sterility*, 64(2), pp.408–413.
- WHO (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> edition (World Health Organization).
- Woolley, J.F., Stanicka, J. e Cotter, T.G., 2013. Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(11), pp.556–565.
- Wu, T.P., Huang, B.M., Tsai, H.C., Lui, M.C. e Liu, M.Y. (2004). Effects of nitric oxide on



human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Archives of Andrology*, 50, pp. 173–179.

- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E. e Vanderpoel, S. (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92(5), pp.1520–1524.
- Zhang, D.X. e Gutterman, D.D. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology: heart and circulatory physiology*, 292(5), pp.2023–2031.
- Zhang, H. e Zheng, R.L., (1996) Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free radical research*, 25(4), pp.347–354.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P. e Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), pp.221-225.
- Zini, A., Lamirande, E. e Gagnon, C. (1995) Low Levels of Nitric Oxide Promote Human Sperm Capacitation In Vitro. *Journal of Andrology*, 16(5), pp.424-431.
- Zini, A. e Al-Hathal, N. (2011). Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian journal of andrology*, 13(3), pp.374–81.
- Zorn, B., Vidmar, G. e Meden-Vrtovec, H. (2003) Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology*, 26(5), pp.279–285.